

Untersuchung der zytotoxischen CD4⁺ T-Zellantwort in der akuten und chronischen Friend Retrovirus Infektion

*Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.*

*der Fakultät für Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen*

*vorgelegt von
Nora Manzke*

*aus Witten
Mai 2013*

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulf Dittmer

2. Gutachter: Prof. Dr. Wiebke Hansen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Daniel Hoffmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2013

Wir haben eine kleine Maus versteckt. Findest Du sie?

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Retroviren..... | 1 |
| 1.1.1 | Struktur und Genom der Retroviren | 1 |
| 1.1.2 | Einfache und komplexe Retroviren | 3 |
| 1.1.3 | Replikationszyklus von Retroviren | 3 |
| 1.1.4 | HIV..... | 6 |
| 1.1.5 | Tiermodelle für HIV..... | 7 |
| 1.1.6 | Der Friend Virus Komplex als Modell für retrovirale Infektionen..... | 8 |
| 1.1.6.1 | Klassifizierung, Aufbau und Besonderheiten muriner Leukämieviren..... | 8 |
| 1.1.6.2 | Pathogenese des Friend Virus Komplexes | 9 |
| 1.2 | Das Immunsystem | 11 |
| 1.2.1 | Das angeborene Immunsystem..... | 11 |
| 1.2.2 | Das adaptive Immunsystem | 15 |
| 1.2.3 | Die adaptive Immunantwort..... | 17 |
| 1.2.3.1 | Aktivierung von T-Zellen..... | 17 |
| 1.2.3.2 | Charakterisierung von zytotoxischen Effektor T-Zellen..... | 18 |
| 1.2.3.3 | CD8 ⁺ T-Zellen..... | 20 |
| 1.2.3.4 | CD4 ⁺ T-Zellen..... | 21 |
| 1.2.3.4.1 | CD4 Subpopulationen. | 22 |
| 1.3 | Das DEREK Mausmodell | 26 |
| 1.4 | Immunreaktion auf eine Friend Virus-Infektion..... | 27 |
| 1.4.1 | Die Kinetik der Friend Virus-Infektion und der beteiligten Immunzellen | 27 |
| 1.4.2 | Die Rolle von zytotoxischen CD8 ⁺ T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion | 27 |
| 1.4.3 | Die Rolle von regulatorischen T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion..... | 28 |
| 1.4.4 | CD4 ⁺ T-Zellen in der Friend Virus Infektion..... | 29 |
| 1.4.4.1 | CD4 ⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion | 29 |
| 1.4.4.2 | CD4 ⁺ T-Zellen in der chronischen FV-Infektion..... | 30 |
| 1.5 | Zielsetzung der vorliegenden Arbeit | 32 |
| 2 | Material..... | 33 |
| 2.1 | Geräte | 33 |
| 2.2 | Verbrauchsmaterial | 34 |
| 2.3 | Versuchstiere | 35 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.3.1 | <i>Wildtyp Mäuse</i> | 35 |
| 2.3.2 | <i>Transgene Mäuse</i> | 35 |
| 2.4 | Chemikalien und Medien | 35 |
| 2.5 | Antibiotika | 36 |
| 2.6 | Häufig verwendete Puffer und Medien | 36 |
| 2.7 | Antikörper | 37 |
| 2.8 | Tetramere und F-MuLV-spezifische Peptide | 38 |
| 2.9 | Kommerzielle Standardtests | 38 |
| 2.10 | Viren und Zelllinien | 39 |

3 Methoden 40

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1 | Tierversuche | 40 |
| 3.1.1 | <i>Infektion</i> | 40 |
| 3.1.2 | <i>Intraperitoneale Injektion</i> | 40 |
| 3.1.3 | <i>Organentnahme</i> | 40 |
| 3.1.4 | <i>Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen</i> | 41 |
| 3.2 | Zellzahlbestimmung | 41 |
| 3.3 | In vivo Herstellung einer Friend Virus Präparation | 42 |
| 3.4 | Herstellung einer Friend Murine Leukemia Virus-Präparation in vitro | 42 |
| 3.5 | Zellkultur | 43 |
| 3.5.1 | <i>Kultivierung von Zellen</i> | 43 |
| 3.5.2 | <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i> | 43 |
| 3.6 | Nachweis von infektiösen Zellen mittels Infectious Center Assay | 44 |
| 3.7 | Durchflusszytometrie | 45 |
| 3.7.1 | <i>Ausschluss toter Zellen in der Durchflusszytometrie</i> | 47 |
| 3.7.2 | <i>Färbung von Oberflächenproteinen</i> | 47 |
| 3.7.3 | <i>Intrazelluläre Färbungen von Granzym B</i> | 47 |
| 3.7.4 | <i>Intrazelluläre Färbung von IFN-γ, TNF-α, IL-2 und IL-4</i> | 48 |
| 3.7.5 | <i>Intrazelluläre Färbung von Foxp3</i> | 48 |
| 3.7.6 | <i>Cell Trace Violet Färbung</i> | 49 |
| 3.7.7 | <i>Tetramerfärbung</i> | 49 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.8 | Depletion von CD8 ⁺ bzw. CD4 ⁺ T-Zellen mittels zell-spezifischer Antikörper..... | 50 |
| 3.9 | Depletion von CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ GFP ⁺ regulatorischen T-Zellen in DEREK Mäusen..... | 50 |
| 3.10 | Stimulation mittels α-CD137 Antikörper | 51 |
| 3.11 | <i>In vivo</i> CTL-Test..... | 51 |
| 3.12 | Bestimmung der Proliferation von bestimmten Zellpopulationen mit Hilfe von α-Ki67 | 52 |

4 Ergebnisse 53

| | | |
|--------|---|----|
| 4.1 | Kinetik der Proliferation FV-induzierter CD4 ⁺ Effektor T-Zellen | 53 |
| 4.2 | Expansion FV-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion | 54 |
| 4.3 | Definition FV-induzierter Effektor CD4 ⁺ T-Zellen..... | 55 |
| 4.4 | Kinetik der Aktivierung FV-induzierter CD4 ⁺ Effektorzellen | 57 |
| 4.5 | Funktionelle Analyse von Effektor CD4 ⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion | 58 |
| 4.5.1 | Analyse der Expression von Effektorzytokinen | 58 |
| 4.5.2 | Analyse der Zytotoxizität der Effektor CD4 ⁺ T-Zellpopulation | 60 |
| 4.5.3 | Kinetik der Proliferation von Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen..... | 62 |
| 4.5.4 | Depletion von regulatorischen T-Zellen und CD8 ⁺ T-Zellen während einer akuten FV-Infektion | 63 |
| 4.5.5 | Einfluss von Tregs und CD8 ⁺ T-Zellen auf die Expansion der Effektor CD4 ⁺ T-Zellen..... | 64 |
| 4.5.6 | Auswirkung von Tregs und CD8 ⁺ T-Zellen auf die Effektorfunktion der CD4 ⁺ T-Zellen..... | 66 |
| 4.5.7 | Die Rolle von Tregs und CD8 ⁺ T-Zellen bei der Kontrolle der zytotoxischen CD4 ⁺ T-Zellantwort | 68 |
| 4.5.8 | Auswirkung der <i>in vivo</i> Stimulation mit anti-CD137 auf die Expansion der Effektor-, sowie FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen | 69 |
| 4.5.9 | Auswirkung der <i>in vivo</i> Stimulation mit anti-CD137 auf die Zytokinproduktion der Effektor CD4 ⁺ T-Zellen | 71 |
| 4.5.10 | Auswirkung der <i>in vivo</i> Stimulation mit anti-CD137 auf das zytotoxische Potential der Effektor CD4 ⁺ T-Zellen | 73 |
| 4.5.11 | Einfluss von zytotoxischen CD4 ⁺ T-Zellen auf die Viruslast..... | 74 |
| 4.6 | Funktionelle Analyse von Effektor CD4 ⁺ T-Zellen in der chronischen FV-Infektion... | 75 |
| 4.6.1 | Analyse der Expansion von Effektor CD4 ⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion | 75 |
| 4.6.2 | Analyse der Expansion von FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion | 76 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.6.3 | <i>Selektive Depletion von Tregs während der chronischen FV-Infektion</i> | 77 |
| 4.6.4 | <i>Auswirkung der Treg Depletion auf die Expansion von CD4⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion.....</i> | 78 |
| 4.6.5 | <i>Analyse der Zytokinexpression von Effektor CD4⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion</i> | 79 |
| 4.6.6 | <i>Analyse der Zytotoxizität der Effektor CD4⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion</i> | 82 |
| 5 | <i>Diskussion</i> | 84 |
| 6 | <i>Zusammenfassung.....</i> | 93 |
| 7 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 96 |
| 8 | <i>Anhang.....</i> | 104 |
| 8.1 | Abkürzungsverzeichnis | 104 |
| 8.2 | Abbildungsverzeichnis | 109 |
| 8.3 | Tabellenverzeichnis | 111 |
| 8.4 | Publikation | 112 |
| 8.5 | Danksagung | 113 |
| 8.6 | Lebenslauf..... | 114 |
| 8.7 | Erklärungen..... | 115 |

1 Einleitung

1.1 Retroviren

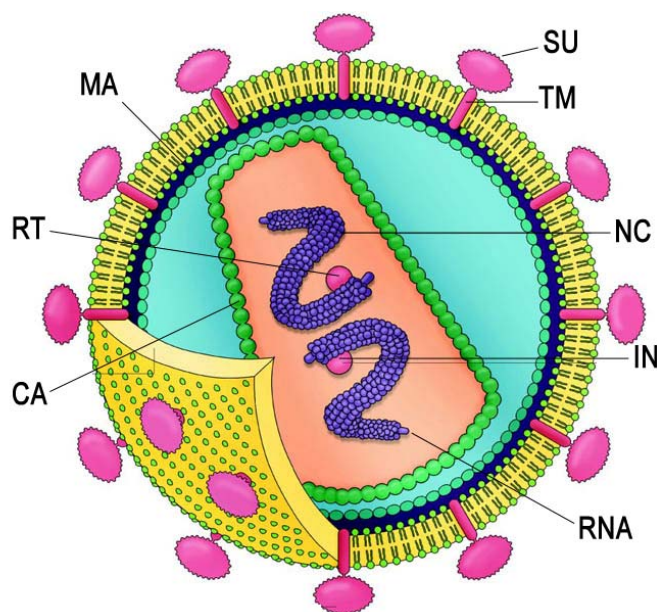
Die Erstbeschreibung von Retroviren geht auf das Jahr 1908 zurück. Bei der Untersuchung einer Leukämie in Hühnern gelang es Ellermann und Bang erstmals, die Erkrankung mittels eines zellfreien Filtrats von kranken auf gesunde Hühner zu übertragen. Drei Jahre später charakterisierten Rous et al. das Rous sarcoma virus (RSV), welches in Hühnern Sarkome induziert (88). In den darauf folgenden Jahren wurde eine Vielzahl an weiteren Retroviren entdeckt, darunter auch das von Charlotte Friend beschriebene Friend murine leukemia virus (F-MuLV) (34). 1980 wurde mit dem Human T-cell leukemia virus-1 (HTLV-1) das erste Retrovirus isoliert, welches mit einer humanen Erkrankung assoziiert war (36). Etwa 2% der mit HTLV-1 infizierten Menschen entwickeln eine adulte T-Zell-Leukämie. 1983 wurde ein bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Retrovirus beschrieben (12), das kurze Zeit später mit dem acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Verbindung gebracht wurde (16). Laut des letzten, anlässlich des World AIDS Days, von UNAIDS veröffentlichten Berichts von 2012 (104), waren im Jahre 2011 weltweit ca. 34 Millionen Menschen mit HIV infiziert (siehe Abschnitt 1.1.4). Die Suche nach geeigneten Impfstoffen dauert seitdem an und derzeitige Therapieansätze können die Progression zu AIDS zwar verhindern, das Virus jedoch nicht komplett eliminieren. Aus diesem Grund streben weltweit zahlreiche Forschungsgruppen mit den unterschiedlichsten Ansätzen danach, Erkenntnisse über die Interaktion zwischen Virus und Wirt zu erlangen. Der Ansatz der vorliegenden Arbeit basiert auf einem murinen Tiermodell (siehe Abschnitt 1.1.6) anhand dessen Erkenntnisse über die Reaktion des Immunsystems auf eine retrovirale Infektion erlangt werden können. Diese Forschung hat zum Ziel, die Kompetenz des Immunsystems im Kampf gegen Retroviren zu verbessern und so eine vollständige Eliminierung des Virus zu erreichen.

1.1.1 Struktur und Genom der Retroviren

Retrovirus ist die Kurzform für Reverse Transkriptase Onkovirus. Bei dieser Virusfamilie handelt es sich um eine höchst divergente Familie von umhüllten RNA-Viren. Allen gemein ist ihr diploides, lineares und einzelsträngiges (single-stranded, ss) RNA-Genom mit einer positiven Polarität und einer Größe von 7-12 Kilobasen

(kb). Retroviren sind die einzigen ssRNA(+)-Viren, die für die Infektion einer Zelle ihr Genom nicht sofort als Matrize einsetzen können. Mittels reverser Transkription müssen sie vorher ihre ssRNA in doppelsträngige (double-stranded, ds) DNA umschreiben und in die DNA der Wirtszelle integrieren.

Die Größe der Virionen beträgt etwa 80–100 nm. Die Hülle (envelope) besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die von der Wirtszelle abgeschnürt wird und zahlreiche virale Glykopeptide enthält. Diese in der Membran des Virions verankerten Glykoproteine sind für die Rezeptorbindung verantwortlich. Durch Disulfidbrücken mit viralen transmembran-Proteinen verbunden, sind diese ihrerseits für die Membranfusion zuständig. Das Nukleokapsid besteht aus den Kapsidproteinen, 2 diploiden ssRNA-Strängen, der Integrase und der Reversen Transkriptase. Dieses wird wiederum wie in Abbildung 1.1 zu sehen von Matrixproteinen und einer Lipiddoppelschicht umgeben.



| | |
|-----------|-------------------------|
| SU | Oberflächenglykoprotein |
| TM | Transmembranprotein |
| MA | Matrixproteine |
| CA | Kapsid |
| NC | Nukleokapsid |
| IN | Integrase |
| RT | Reverse Transkriptase |

Abbildung 1.1 Schematischer Aufbau eines Retrovirus (107)

Die von Retroviren kodierte genetische Information ist bei allen Retroviren in drei Hauptgene (gag, pol, env) unterteilt (Abbildung 1.2). Das gag-Gen kodiert Informationen für die Synthese interner Strukturproteine wie die Matrix-, die Kapsid- und die Nukleoproteinstruktur. Das pol-Gen kodiert die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase, Protease und die RNase H. Das env-Gen enthält Informationen für die Oberflächen- und Transmembran-Komponenten des viralen

Hüllproteins. Die genannten Gene liegen zwischen einer 200-600 Basenpaare (bp) langen Wiederholungseinheit (long terminal repeat, LTR). Diese Einheiten flankieren die Gene und befähigen diese zur Integration in das Wirtsgenom. Da die LTR alle Sequenzen enthält, die zur Regulierung der Genexpression notwendig sind, steuern bzw. terminieren sie außerdem die Transkription.

1.1.2 Einfache und komplexe Retroviren

Aufbauend auf der Genomorganisation, bzw. der Translation akzessorischer Proteine, wird zwischen einfachen und komplexen Retroviren unterschieden. Die einfachen Retroviren besitzen ausschließlich die oben erwähnten Gene gag, pol und env. Das murine Leukämievirus F-MuLV (Friend Murine Leukemia Virus) ist ein typischer Vertreter dieser Gruppe. Komplexe Retroviren, wie das zu den Deltaretroviren gehörende HTLV, das zu den Lentiviren gehörende HIV oder das zu den Spumaviren gehörende Foamyvirus, enthalten weitere akzessorische Gene mit regulatorischer Funktion. Sie verstärken beispielsweise die Transkription viraler Gene, die Virionenproduktion, die Virusfreisetzung und regulieren zudem die Infektiosität. Abbildung 1.2 zeigt den unterschiedlichen Genomaufbau beider Gruppen.

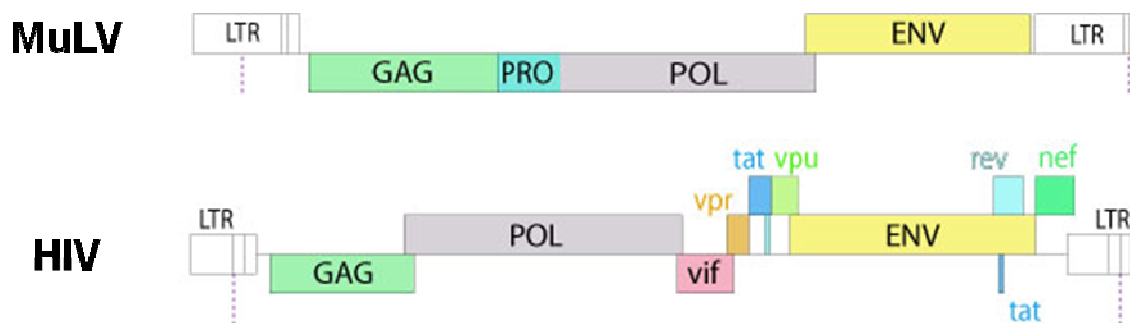


Abbildung 1.2 Repräsentative Genome einfacher (MuLV) und komplexer (HIV-1) Retroviren

verändert nach (111)

1.1.3 Replikationszyklus von Retroviren

Abbildung 1.3 zeigt den mehrschrittigen Prozess der retroviralen Replikation. Der erste Schritt ist die Bindung des Glykoproteins der Virushülle an seinen Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche (1.). Um das virale Kapsid in das Zytoplasma der Wirtszelle

zu befördern, muss die virale Membran mit der Wirtszellmembran fusionieren (2.). Im Folgenden löst sich das Kapsid auf, so dass die RNA und verschiedene virale Proteine, wie z.B. die Reverse Transkriptase und Integrase freigesetzt werden. Nach Aktivierung der Reversen Transkriptase wird die ssRNA im Zytoplasma in dsDNA umgeschrieben (3.). Da die Reverse Transkriptase jedoch keine Korrekturlesefunktion hat, ist dieser Prozess relativ fehleranfällig, was zu häufigen Virusmutationen führt. Die dsDNA wird nun mit Hilfe sowohl zellulärer als auch viraler Proteine in den Zellkern transportiert (4.). Die Integrase spaltet als Endonuklease das Wirtsgenom und integriert die virale DNA (Präintegrationskomplex) (5). Hierzu schneidet die Integrase zuerst die Enden der viralen DNA und dann an einer beliebigen Stelle die Wirts-DNA und verbindet diese miteinander. So entsteht das Provirus, nachdem entstandene Lücken durch DNA-Reparaturenzyme aufgefüllt und der DNA Doppelstrang durch Ligasen geschlossen wurde. Zur Transkription der DNA des Provirus werden nun die RNA-Polymerase II und verschiedene andere Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle rekrutiert. Die entstandene mRNA wird ins Zytoplasma transportiert (6.). Hier findet auch die Translation der verschiedenen viralen Vorläuferproteine statt (7.). Das virale Kapsid entsteht nun durch Einstülpung der zellulären Plasmamembran zu einem unreifen Viruspartikel (8.). Hier beginnt die virale Protease sich autokatalytisch aus dem Vorläuferprotein herauszuschneiden und die anderen Vorläuferproteine in seine Komponenten (Matrix, Kapsid, Nukleokapsid, Reverse Transkriptase, Intergrase) zu spalten. Die Abschnürung des entstehenden Viruspartikels erfolgt an der Wirtszellmembran und wird als „Budding“ bezeichnet (9.). Schlussendlich lagern sich die Kapsidproteine zu einem konischen Kapsid zusammen und die Spaltung der Vorläuferproteine in die jeweiligen Komponenten wird abgeschlossen. Erst am Ende dieses Reifungsprozesses ist der freigesetzte Viruspartikel infektiös.

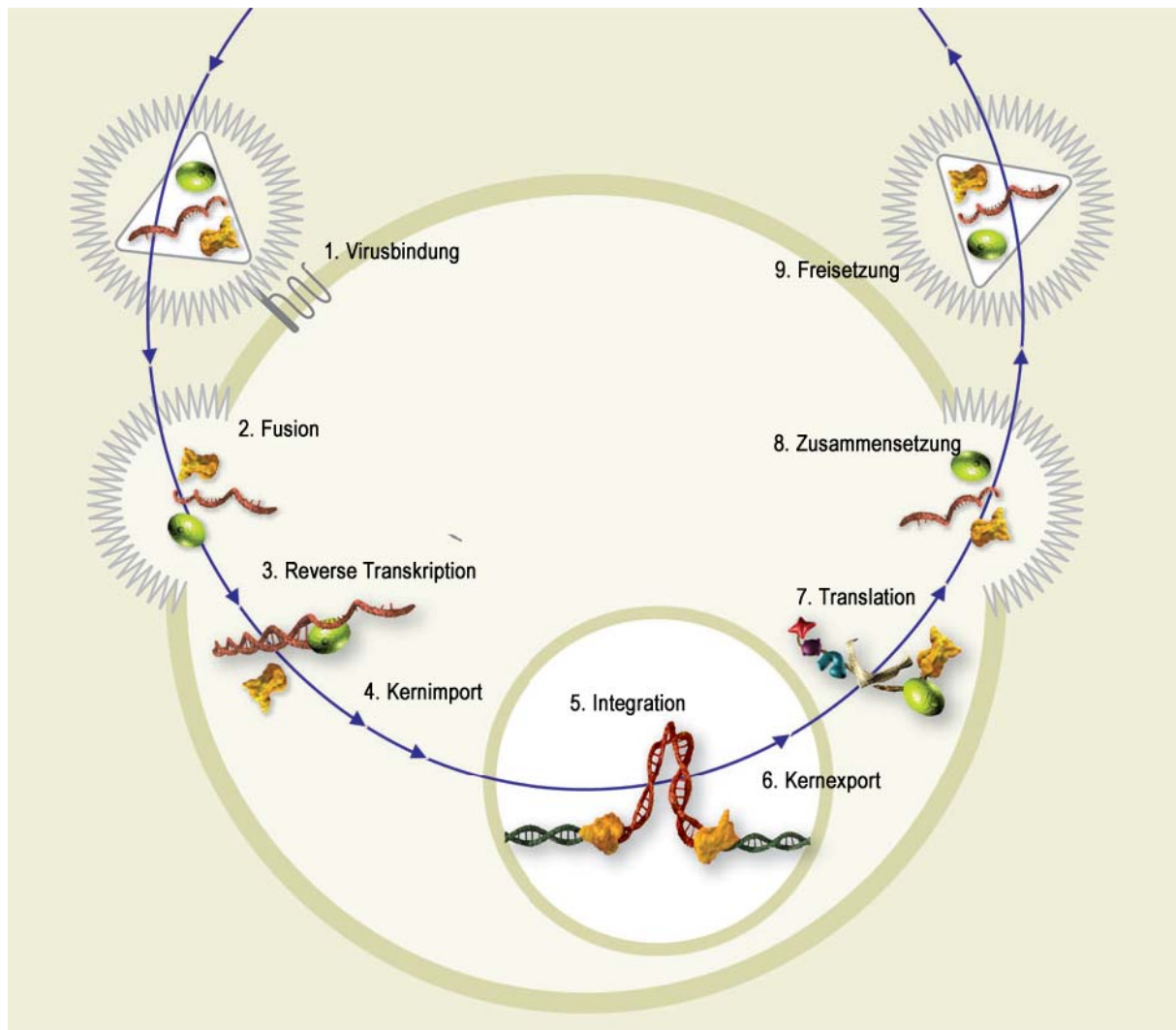


Abbildung 1.3 Replikationszyklus von Retroviren

verändert nach (73)

1. Bindung des Viruspartikels an einen spezifischen Rezeptor an der Oberfläche der Wirtszelle
2. Fusion des Viruspartikel mit der Zellmembran und Internalisierung des Viruskapsids in das Zytoplasma
3. Reverse Transkription
4. Transport der synthetisierten dsDNA in den Zellkern
5. Integration der viralen dsDNA ins Wirtsgenom (Provirus) und Transkription des Provirus
6. Transport viraler mRNA ins Zytoplasma
7. Translation der viralen mRNA
8. Verpackung der viralen RNA und der viralen Proteine
9. Freisetzung von neuen Viruspartikeln

1.1.4 HIV

Die erste Berichterstattung über AIDS (erworbenes Immundefizienz Syndrom) geht auf das Jahr 1981 zurück. Hier wurde in einer amerikanischen Fachzeitschrift des CDC (Center for Disease Control and Prevention) von 5 jungen Männern berichtet, welche an einer seltenen Lungenentzündung erkrankt waren (*Pneumocystis carinii*). Zwei Jahre später konnten die Forscher Barre-Sinoussi, Chermann und Montagnier erstmals ein bis dahin unbekanntes humanes Retrovirus isolieren (12), welches ein Jahr später mit AIDS in Verbindung gebracht werden konnte (16). Die vom HI-Virus verursachte Erkrankung wird heute als AIDS bezeichnet. Das Isolat von Barre-Sinoussi (12), sowie weitere Isolate (59, 78) wurden später unter der Bezeichnung "Humanes Immundefizienzvirus Typ 1" (HIV-1) zusammengefasst. 1986 wurde eine genetische Variante des HIV-1 entdeckt und als HIV-2 beschrieben (19). Diese Variante ähnelt HIV-1 hinsichtlich des klinischen Verlaufs und der pathogenen Eigenschaften, wobei die Aminosäuresequenz-Homologie zwischen beiden Erregern nur etwa 50% beträgt. Mittlerweile ist sie weitestgehend durch HIV-1 verdrängt worden. Nach Übertragung des HI-Virus durch Körperflüssigkeiten wie Blut, Sperma, Vaginalsekret oder Muttermilch kommt es zu einer vier bis sechswöchigen akuten Phase der Infektion, welche von grippeähnlichen Symptomen begleitet ist. Hierauf folgt die Latenzphase, in der sich das Virus vermehrt, die aber weitestgehend symptomfrei ist. Diese Phase kann wenige Monate bis zu mehrere Jahre andauern. Schließlich entwickeln die betroffenen Patienten einen schlechten Allgemeinzustand und verschiedene, AIDS definierende, opportunistische Infektionen. Inzwischen ist HIV-1 weltweit verbreitet und es handelt sich um eine weltweite Epidemie, wobei Afrika südlich der Sahara weiterhin die Hauptlast trägt. Von allen weltweit ca. 34 Millionen Infizierten leben 22 Millionen in Afrika. Außerdem werden etwa 70% aller AIDS Todesfälle in dieser Region verzeichnet (104).

Obwohl gleich nach der Entdeckung von HIV im Jahre 1983 die ersten Studien zur Entwicklung eines Impfstoffes einsetzten und seitdem ungeheure Anstrengungen unternommen wurden, vermittelt bis heute keine der entwickelten Prototyp-Vakzinen einen Schutz vor der HIV-Infektion. Dies ist hauptsächlich durch die hohe Mutationsrate des HI-Virus bedingt. So kann es sich sehr schnell der Erkennung durch spezifische impfstoffinduzierte Abwehrmechanismen entziehen (Immuneescape). Die einzige derzeit wirksame antiretrovirale Therapie ist die Hochaktive Antiretrovirale Therapie (Highly Active Anti-Retroviral Therapy, HAART).

Bei dieser Therapie handelt es sich um eine Kombinationstherapie mit Arzneimitteln aus verschiedenen Wirkungsklassen wie z.B. nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, nicht-nukleosidische Reverse-Transkriptase-Hemmer, Protease- und Integrasehemmer. Der Vorteil dieser Therapie gegenüber Monotherapien ist, dass es dem Virus sehr schwer gemacht wird, sich durch Mutation den verschiedenen Wirkstoffen zu entziehen. Durch einen Angriff auf gleich mehrere virale Strukturen wird so eine Resistenzbildung vermindert. Allerdings kann mit dieser Therapie nur die Entwicklung von AIDS verhindert werden, eine Heilung durch Eliminierung des Virus ist nicht möglich, da das HI-Virus weiter persistiert. Weitere Nachteile dieser Therapie sind die starken Nebenwirkungen der einzelnen Medikamente und die hohen Kosten. Letztere führten dazu, dass die vorhandenen Medikamente nur einem kleinen Teil der Weltbevölkerung zugänglich waren. Dies hat sich in den vergangenen Jahren stark verbessert, so dass im Jahre 2011 54% der HIV Infizierten in Niedrig- und Mittellohnländern eine entsprechende Therapie in Anspruch nehmen konnten (104).

1.1.5 Tiermodelle für HIV

Ein weiteres Problem der HIV Forschung ist die begrenzte Anzahl an aussagekräftigen Tiermodellen. Nur Schimpansen lassen sich reproduzierbar mit HIV-1 infizieren. Allerdings replizieren die meisten HIV-1 Isolate in Schimpansen sehr schlecht und eine AIDS-ähnliche Erkrankung entwickelt sich eher selten (75, 76). Zudem sprechen ethische und finanzielle Gründe gegen Experimente mit Schimpansen. Aus diesem Grund wurden zahlreiche Studien zur Untersuchung der Immunantwort gegen Retroviren in Rhesusmakaken mit dem verwandten Simian Immunodeficiency Virus (SIV) durchgeführt. Allerdings trifft die Forschung auch an diesen Tieren auf zahlreiche limitierende Faktoren. So sind Rhesusmakaken nur in sehr limitierter Zahl verfügbar, haben einen sehr heterologen genetischen Hintergrund und es besteht nur ein begrenztes Wissen über die molekulare Immunologie von Affen. Aus diesen Gründen ging man zusätzlich dazu über, Grundlagen der Retrovirusimmunologie im Mausmodell zu erforschen. Ein Vorteil des Mausmodells ist der genetisch definierte immunologische Hintergrund der Tiere, wobei kongene, transgene und knockout Tiere von besonderer Bedeutung für aussagekräftige Experimente sind. Weil Mäuse nicht mit HIV oder SIV infiziert werden können, benötigt man jedoch murine Retroviren. Es gibt eine große Anzahl

onkogener Retroviren in der Maus, jedoch induzieren sehr viele dieser Retroviren nur bei neugeborenen Mäusen eine Erkrankung, während sie bei erwachsenen Tieren apathogen sind. Das Friend Virus (FV) ist ein Retrovirus-Komplex, welcher in erwachsenen Mäusen eine letale Erythroleukämie verursachen kann. Es wird zwischen suszeptiblen und resistenten Mausstämmen unterschieden. Diese unterscheiden sich vorwiegend in Genen, die dem Haupthistokompatibilitätskomplex (Abk. MHC von engl. Major Histocompatibility Complex), genauer der H-2 Region auf Chromosom 17 zugeordnet werden. Resistente Mäuse sind homozygot für das b Allel der H-2A Region. Suszeptible Mäuse hingegen haben kein oder nur ein b Allel in dieser Region (43). Bedingt durch die unterschiedliche Pathogenese von FV in der Maus im Gegensatz zu HIV im Menschen ist die FV-Infektion als Modell für die Erforschung pathologischer Aspekte der Infektion nicht geeignet. Allerdings sind in der akuten Phase einer FV-Infektion und einer HIV- oder SIV-Infektion große Ähnlichkeiten in der Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem jeweiligen Retrovirus zu beobachten (25). Daher lassen sich die immunologischen Merkmale einer retroviralen Infektion gut am FV-Modell untersuchen. Das Friend Virus Mausmodell wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Grundlagenmodell verwendet, um die Abläufe der Immunantwort in der akuten und der chronischen Infektion zu untersuchen und zu charakterisieren.

1.1.6 Der Friend Virus Komplex als Modell für retrovirale Infektionen

1.1.6.1 Klassifizierung, Aufbau und Besonderheiten muriner Leukämieviren

Murine Leukämieviren werden zu den Gammaretroviren gezählt und besitzen ein einfach aufgebautes Genom und können verschiedene Leukämien induzieren. Das Isolat von Gross und Moloney (1960) führt in infizierten Mäusen zu einer T-Zell-Leukämie, während die Isolate von Rauscher (1962) und Friend (1957) zu einer Erythroleukämie führen. Weitere Erkrankungen, die durch MuLV verursacht werden können, sind MAIDS (murine acquired immunodeficiency syndrom), sowie Sarkome und Thymome (44, 89, 96).

Je nach Art ihres Rezeptors sind die murinen Leukämieviren in der Lage, nur Zellen von Nagern oder auch von anderen Säugern zu infizieren (amphotrophe oder polytrophe Viren). Einige Viren können zwar die Zellen verschiedener Spezies, aber keine Mauszellen infizieren (xenotrophe Viren) oder sie sind auf die Infektion von Maus- und Rattenzellen beschränkt (ecotrophe Viren).

Die Lipiddoppelschicht der murinen Leukämieviren enthält ein ikosaedrisches Kapsid, in dem sich wiederum die ssRNA befindet. In diesem Kapsid befindet sich neben den drei Virus-kodierten Enzymen (Reverse Transkriptase, Integrase und Protease) auch die zelluläre t-RNA, welche als Primer für die virale DNA-Synthese dient. Das virale Genom hat eine Gesamtgröße von ca. 8,2 kb und besteht aus zwei identischen unsegmentierten ssRNA-Strängen. Wie alle einfachen Retroviren besteht auch das Genom des FV ausschließlich aus den Genen gag, pol und env. Das gag-Gen kodiert für die internen Strukturproteine des Virions. Es wird als Vorläuferprotein (Pr65Gag) gebildet und dann in seine vier Untereinheiten gespalten (p30Gag, p15Gag, p12Gag und p10Gag). Das pol-Gen ist durch ein Stopp-Codon vom gag-Gen getrennt und liefert die Informationen für die Reverse Transkriptase und Integrase. Durch das Überlesen des Stopp-Codons wird die mRNA in ein Gag-Pol-Polyprotein translatiert. Anders als bei anderen einfachen Retroviren wird das glykosylierte Gag-Pol-Polyprotein (gGag) an die Zelloberfläche transportiert. Eine mögliche Erklärung hierfür stammt von APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3) defizienten Mäusen. FV, welche nicht in der Lage sind gGag zu synthetisieren, können ausschließlich in diesen defizienten Mäusen replizieren. Es wird daher vermutet, dass gGAG dafür verantwortlich ist, die antivirale Funktion von APOBEC3 zu inhibieren (56).

Die Virionprotease wird von einem weiteren Genabschnitt (pro) kodiert, welcher sich im Leseraster vor pol befindet. Das env-Gen kodiert für die viralen Hüllproteine gp70 und p15E. Beide werden von einem Vorläuferprotein (85 kDa) gebildet und am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) translatiert und im ER glykosyliert. Im Golgi-Apparat wird das Vorläuferprotein nach einer weiteren Glykosylierung in die zwei Einheiten gespalten. Gp70 und p15 sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Dieses Protein ist für viele biologische Eigenschaften von MuLV verantwortlich, z.B. Rezeptorerkennung, Wirtsspezifität, Rezeptor-Interferenz und Antigenität (46).

1.1.6.2 Pathogenese des Friend Virus Komplexes

Beim ecotrophen Friend Virus (FV) handelt es sich um einen Komplex bestehend aus dem pathogenen, aber replikationsunfähigen SFFV (spleen focus forming virus) und dem replikationskompetenten, aber in adulten Mäusen apathogenen F-MuLV. Die Replikationsunfähigkeit des SFFV beruht auf größeren Deletionen in den Genen

gag und env. Es ist dem SFFV somit unmöglich, virale Partikel zu bilden. Erst eine Koinfektion der Wirtszellen mit beiden Viren (F-MuLV und SFFV) ermöglicht es dem SFFV seine RNA in F-MuLV kodierte Viruspartikel zu verpacken. Zwar ist die Infektion adulter Mäuse mit F-MuLV apathogen, neugeborene Mäuse entwickeln hingegen Splenomegalien, Anämien und Leukämien. Dies ist auf das noch nicht voll ausgebildete Immunsystem dieser neugeborenen Mäuse zurückzuführen (34). Der Rezeptor für F-MuLV heißt Pit-1/2 (inorganic phosphate transporter) (23). Die Zielzellen sind Granulozyten, Monozyten, B-Lymphozyten und Erythrozytenvorläuferzellen (28). Der Rezeptor für das SFFV ist unbekannt.

Die Pathogenese der FV-Infektion lässt sich in drei Schritte gliedern. Nachdem das SFFV Erythroblasten infiziert hat, wird ein defektes env kodiertes Glykoprotein gp55 an der Zelloberfläche exprimiert. Durch Bindung dieses Glykoproteins an den Erythropoetin-Rezeptor von kernhaltigen Erythrozytenvorläuferzellen, wird eine polyklonale Proliferation dieser Zellen induziert. Gp55 stellt ein konstitutives Mitogen für Erythrozytenvorläuferzellen dar (22, 55). Durch dieses falsche Proliferationssignal werden die wichtigsten Zielzellen für das FV zur Proliferation angeregt. Im zweiten Schritt der FV Pathogenese wird das SFFV nach dem Zufallsprinzip in das Wirtsgenom integriert. Hierbei kann ein zelluläres Onkogen der ets-Familie aktiviert werden. Der dritte Schritt besteht aus der Inaktivierung des Tumorsuppressor-Gens p53 (55). Alle drei Schritte sind für die Entstehung einer Erythroleukämie notwendig. Für die Arbeit mit dem FV im murinen Modell wird zwischen suszeptiblen und resistenten Mausstämmen unterschieden. Suszeptible Mäuse entwickeln nach Infektion eine massive Splenomegalie, bei der das Milzgewicht auf das zehn- bis zwanzigfache des Normalgewichts ansteigen kann. Das Immunsystem dieser Mäuse ist nicht in der Lage, eine schützende Immunantwort gegen das FV auszubilden, so dass die Tiere 3-4 Wochen nach Infektion eine maligne Erythroleukämie entwickeln (68). Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich resistente Mäuse (C57BL/6) verwendet. Bei diesen Tieren führt die FV-Infektion aufgrund einer starken Immunantwort nicht zur Ausbildung einer malignen Erythroleukämie. Sie entwickeln eine leichte Splenomegalie, die sich nach etwa zwei bis drei Wochen wieder zurückbildet. Die vollständige Viruselimination ist jedoch auch ihnen nicht möglich und die Tiere bleiben somit lebenslänglich persistent infiziert. Für die FV-Resistenz sind verschiedene Gene verantwortlich, wobei es mindestens sechs Gene gibt (Fv 1-6), die eine Resistenz auf nicht-immunologischer Grundlage induzieren (100) und

mindestens vier Gene des MHC, die die zelluläre und humorale Immunantwort gegen das FV beeinflussen. In der Maus wird MHC als H-2 bezeichnet und die verwendeten C57BL/6 Mäuse tragen den H-2^b Haplotyp. Sie können deutlich mehr CD4 Epitope präsentieren und sind daher resistent gegen eine FV-induzierte Erythroleukämie (72). Balb/c Mäuse mit einem H-2^a Haplotyp sind hingegen suszeptibel. Hinzu kommt, dass C57BL/6 Mäuse das nicht immunologische Resistenzgen Fv-2 tragen, welches die polyklonale Zellaktivierung von Erythrozytenvorläuferzellen und die damit verbundene Splenomegalie limitiert (44).

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem stellt, anders als das Herz-Kreislauf-, Atmungs- oder Verdauungssystem keine klar abgrenzbare Struktur innerhalb des Körpers dar. Vielmehr setzt es sich aus einer Vielzahl von Strukturen und Zelltypen zusammen, die gemeinsam dem Schutz vor Infektionen, sowie der Homöostase dienen. Das Immunsystem bekämpft in den Körper eingedrungene Fremdorganismen, wie Viren und Bakterien und kann körpereigene Zellen zerstören, welche sich fehlerhaft verändert haben. Klassischer Weise wird das Immunsystem in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt, wobei jedes weiter in zelluläre- und humorale Bestandteile untergliedert werden kann.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist immer der erste Abwehrmechanismus, der nach einer Infektion, also dem Eindringen von Pathogenen, in Aktion tritt. Zu dem zellulären Teil des angeborenen Immunsystems zählen Makrophagen (MΦ), Dendritische Zellen (DC), Natürliche Killerzellen (NK), neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten (32). MΦs befinden sich in allen Geweben und bilden dort geringfügig verschiedene Eigenschaften aus. Das eingedrungene Pathogen wird aufgrund der auf seiner Oberfläche expremierten körperfremden Proteine erkannt und phagozytiert. Anschließend wird es intrazellulär abgebaut, und die entstandenen Fragmente (Antigene) werden im Kontext eines MHC Moleküls auf der Oberfläche der Makrophagen präsentiert (3).

Genau wie MΦs sind DCs in Geweben lokalisiert, erkennen eingedrungene Erreger und nehmen diese durch Makropinozytose auf. Daraufhin migrieren sie in den nächsten lokalen Lymphknoten, um die Antigene der internalisierten Pathogene dort T- Lymphozyten zu präsentieren und fungieren so als Antigen-präsentierende Zellen

(APC). Makrophagen und dendritische Zellen sind also an der unspezifischen Eliminierung von Pathogenen beteiligt und können zusätzlich über eine Aktivierung der T-Zellen eine gezielte Immunantwort induzieren. Man beschreibt sie deshalb auch als Vermittler zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort (99). Die Antigenpräsentation durch APCs erfolgt grundsätzlich mit zelleigenen Oberflächenmolekülen, den so genannten MHCs. Alle MHC Moleküle sind durch eine Furche gekennzeichnet, in welche die prozessierten Antigene eingelagert werden. Grundsätzlich wird zwischen MHC-I und MHC-II Molekülen unterschieden (Abbildung 1.4). MHC-I Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen expremiert. MHC-II Moleküle werden ausschließlich auf APCs expremiert, also B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen und wenigen spezialisierten Zellen in lymphatischen Geweben. Während die Bindungsfurche bei MHC-I Molekülen durch eine α -Kette geformt wird, besteht sie bei MHC-II Molekülen aus einer α - und einer zusätzlichen β -Kette. Außerdem ist die Bindungsfurche bei MHC-I Molekülen an den Seiten geschlossen, so dass die Länge des gebundenen Peptids sehr begrenzt ist. Bei MHC-II Molekülen ist die Bindungsgrube seitlich geöffnet, so dass gebundene Peptide seitlich hinausragen können.

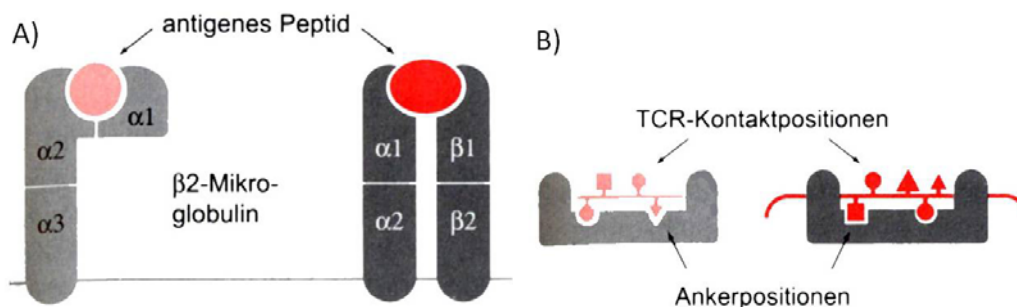


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der MHC-I und II Moleküle

A) Aufbau der MHC-I links und MHC-II Moleküle. B) geschlossene Peptidbindungsgrube der MHC-I- (links) und offene Peptidbindungsgrube der MHC-II Moleküle (rechts). Die Bindungsgrube verfügt über Ankerpositionen, die gewährleisten, dass die Peptidpräsentation spezifisch ist (93).

Ob ein Antigen innerhalb eines MHC-I oder MHC-II Moleküls präsentiert wird, bestimmt im Folgenden, welchen Zellen das Antigen als solches erkennen. $CD8^+$ T-Zellen lassen sich ausschließlich durch MHC-I präsentierte Antigene aktivieren,

während $CD4^+$ T-Zellen ausschließlich durch MHC-II Präsentation aktiviert werden. Sowohl MHC-I, als auch MHC-II Moleküle werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert (Abbildung 1.5).

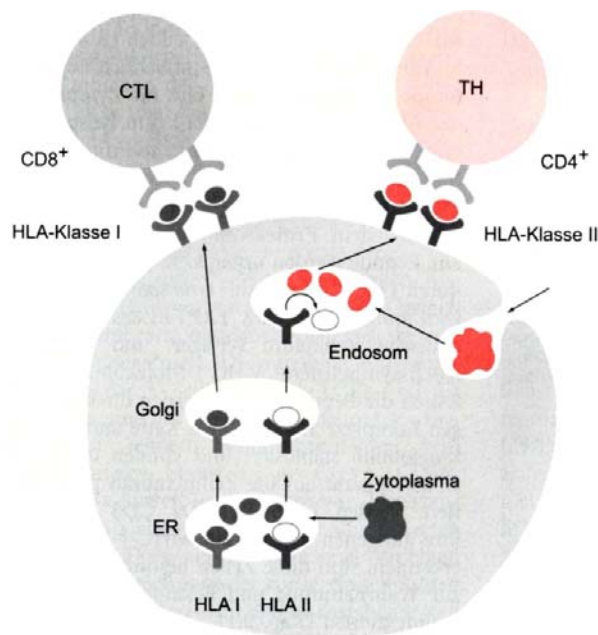


Abbildung 1.5 MHC Prozessierung.

Während MHC-I Moleküle im ER mit intrazellulären Antigenen beladen werden, werden MHC-II Moleküle zwar ebenfalls im ER synthetisiert, jedoch erst in Endosomen mit extrazellulären Antigenen beladen (93).

Allerdings werden nur MHC-I Moleküle auch hier mit ihren Antigenen beladen. MHC-I Moleküle werden mit Antigenen beladen, welche hauptsächlich aus dem Zytoplasma der Zelle stammen, wo sie durch das Proteasom in Peptide zerlegt werden. Nach der Beladung der MHC-I Moleküle mit Antigenen im ER werden die Komplexe über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transportiert. MHC-II Moleküle werden nach der Synthese im ER über den Golgi-Apparat in Endosomen befördert. In diesen Kompartimenten herrscht ein saures Milieu, in dem Proteinasen aktiv sind, welche extrazellulär aufgenommene Antigene proteolytisch degradieren. Die entstandenen Fragmente werden im Endosom auf die MHC-II Moleküle geladen. Die so entstandenen Komplexe werden von hier auf die Zelloberfläche transportiert. Die in dieser Arbeit angewendete Tetramer-Technologie (siehe Abschnitt 3.7.7) beruht auf der spezifischen Bindung von viralen Antigenen an MHC Moleküle. Rekombinant produzierte MHC Ketten werden in Anwesenheit des spezifischen Peptids, in diesem Falle das MHC-II FV-spezifische $CD4^+$ T-Zellepitop (H19-

Env;EPLTSLTPRCNTAWNRLKL), renaturiert und tetramerisiert. Zudem ist das Tetramer mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Hierdurch wird es möglich, durchflusszytometrisch alle CD4⁺ T-Zellen zu detektieren, die eine Spezifität für dieses Epitop besitzen.

NK-Zellen, besitzen keine Antigen-spezifischen Rezeptoren und können Virus-infizierte Zellen oder Krebszellen daran erkennen, dass diese im Gegensatz zu gesunden naiven Zellen, kaum MHC Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. NK-Zellen zirkulieren im Blut und töten pathogene Zellen durch die Freisetzung ihrer lytischen Granula (17).

Neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten werden nach einer Infektion vermehrt im Knochenmark gebildet und zu den Entzündungsstellen rekrutiert. Neutrophile Granulozyten nehmen dort Infektionserreger in ihre intrazellulären Vesikel auf oder töten sie durch die Sekretion freier Sauerstoffradikale. Eosinophile und basophile Granulozyten töten vorwiegend über die Sekretion toxischer Substanzen (50).

Zum humoralen Teil des angeborenen Immunsystems zählt das Komplementsystem. Hierbei handelt es sich um ein kaskadenartiges Zusammenspiel aus 25 Serumproteinen, welches über drei verschiedene Wege durch Pathogenstrukturen oder Antigen/Antikörper-Komplexe aktiviert werden und schließlich lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen und Erreger für eine Eliminierung durch Phagozytose opsonieren (33).

Weitere humorale Komponenten sind die antimikrobiellen Faktoren, von denen z.B. Lysozym sehr verbreitet ist (54).

Im Verlauf der Evolution hat sich das angeborene Immunsystem auf immer wiederkehrende pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) eingestellt und entsprechend keimbahnkodierte Erkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs) entwickelt, die besonders von Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert werden (13, 50).

Durch die Bindung verschiedener PAMPs an ihre entsprechenden Rezeptoren kommt es zur Aktivierung verschiedener Signalwege, was zu einer Expression von Interferon (IFN) und proinflammatorischen Zytokinen, wie Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6 und IL-12, führt (14, 51).

Zu den PRRs gehören die auf der Oberfläche und in den Endosomen von APCs lokalisierten Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like-Receptor, TLR), im Zytosol

vorkommende RIG-I (retinoic acid-inducible gene I)-ähnliche RNA Helikasen und NOD (nucleotide binding oligomerization domain)-ähnliche Rezeptoren (NLR). Das PRR-Repertoire, welches eine Zelle expremiert, ist von ihrem Zelltyp und ihrer Differenzierung abhängig.

1.2.2 Das adaptive Immunsystem

Die Reaktion auf eingedrungene Pathogene vollzieht sich bei dem adaptiven Immunsystem im Vergleich zum angeborenen Immunsystem langsamer. Angesichts der sich ständig verändernden Umwelt ist es aber essentiell, ein Höchstmaß an Flexibilität bezüglich der spezifischen Erkennung potentieller Krankheitserreger zu besitzen. Außerdem ist es in der Lage, sich an bereits bekämpfte Pathogene zu erinnern und bei einem Zweitkontakt schneller zu reagieren (immunologisches Gedächtnis). Das adaptive Immunsystem besteht aus Lymphozyten (T-Zellen und B-Zellen). Diese befinden sich in großer Anzahl im Blut, in der Lymphe und in den lymphoiden Organen. Die B-Zellen entwickeln sich direkt aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, während die T-Zellen von der fötalen Leber bzw. vom Knochenmark in den Thymus wandern und dort ausreifen (37).

Nach ihrer Aktivierung entwickeln sich B-Zellen zu Plasmazellen, deren Hauptaufgabe darin besteht, Immunglobuline (Antikörper) zu produzieren und in löslicher Form ins Blutplasma zu sezernieren (humorale Komponente des adaptiven Immunsystems). Diese Antikörperproduktion kann abhängig und unabhängig von T-Zellen sein. Menschen, die keine T-Zellen besitzen, weisen allerdings eine geringere Antikörperantwort auf (38). Antikörper sind hochspezifisch und binden mit hoher Affinität jeweils ein Antigen (Epitop). Es wird geschätzt, dass jeder Mensch ca. 10^6 verschiedene Antikörperspezifitäten besitzt (93), wobei die Spezifität eines Antikörpers immer dieselbe ist, wie die der Plasmazelle, von der er sezerniert wurde. Grundsätzlich helfen Antikörper bei der Aktivierung des Komplementsystems und der Opsonierung und Neutralisierung von Pathogenen. Anhand von Sequenzunterschieden am Carboxyterminus werden Antikörper in fünf verschiedene Antikörperklassen (Isotypen) unterteilt (IgM, IgD, IgE, IgA, IgG). Zu Beginn einer Immunantwort werden B-Zellen aktiviert, worauf hin sie klonal proliferieren und schließlich große Mengen des IgM-Antikörpers sezernieren. Im Verlauf einer Immunantwort kommt es zu einem Klassenwechsel (Isotypenwechsel), wodurch verschiedene Funktionen als Reaktion auf dasselbe Antigen erfüllt werden können.

Dieser Klassenwechsel wird verursacht durch Zytokine, die von T-Zellen sezerniert werden.

B-Zellen, aber auch T-Zellen bilden den zellulären Teil der adaptiven Immunantwort. Sie wandern von der fötalen Leber bzw. vom Knochenmark in den Thymus, um dort auszureifen (37). T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche den T-Zell-Rezeptor (TCR), welcher für die Antigenbindung verantwortlich ist. Er besteht aus zwei Ketten, meist α - und β - Ketten, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und in der Zellmembran verankert sind. Wie bei den B-Zellen ist die Antigenbindung des TCR spezifisch und unterscheidet sich zwischen individuellen T-Zellen. Durchschnittlich enthält der menschliche Organismus ca. 10^6 verschiedene Spezifitäten (93).

TCRs sind stets assoziiert mit CD3 Komplexen, weshalb dieser Komplex auch zum diagnostischen T Zellenachweis verwendet wird. Die CD-Nomenklatur (clusters of differentiation) wird verwendet, da sich Lymphozyten morphologisch kaum unterscheiden lassen. Daher bedient man sich zur Unterscheidung ihrer Oberflächenmoleküle. Sie werden mit der Abkürzung CD und einer entsprechenden Zahl bezeichnet. CD4- und CD8- Moleküle sind Glykoproteine, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören und als Ko-Rezeptoren des T-Zellrezeptors (TCR) fungieren. Das CD4- Molekül wurde in den siebziger Jahren entdeckt und stellt einen Ko-Rezeptor für MHC-II restringierte Antigen-induzierte T-Zellaktivierung dar. CD8 hingegen ist ein transmembranes Glykoprotein, welches spezifisch an das MHC-I-Protein bindet (118). Während $CD8^+$ T-Zellen vorwiegend zytotoxische Effektorfunktionen ausüben, handelt es sich bei $CD4^+$ T-Zellen um eine weitaus heterogenere Klasse, die in verschiedene Subtypen unterteilt wird und der verschiedenste Funktionen zukommen. Die wohl wichtigste Funktion ist die Helferfunktion. So können T-Helferzellen die Antikörperproduktion von B-Zellen induzieren und den bereits erwähnten Klassenwechsel der B-Zellen veranlassen. Außerdem sind sie essentiell für die Aktivierung der $CD8^+$ T-Zellen und der APCs.

Die Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene, wie Viren, Parasiten und Bakterien, wurde lange Zeit hauptsächlich den zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen, sowie den NK-Zellen zugeschrieben. Jüngere Publikationen zeigen jedoch, dass außerdem $CD4^+$ T-Zellen eine direkte antivirale, zytotoxische Effektorfunktion aufweisen können (65). Im Zytoplasma zytotoxischer Effektorzellen befinden sich lytische Granula, welche aus modifizierten Lysosomen hervorgehen. Diese Granula enthalten

verschiedene Effektorproteine, die durch die Freisetzung aktiviert werden und infizierte Zielzellen lysieren.

1.2.3 Die adaptive Immunantwort

1.2.3.1 Aktivierung von T-Zellen.

Die Aktivierung naiver T-Zellen erfolgt in peripheren lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten oder der Milz. Naive T-Zellen, exprimieren wie alle naiven Lymphozyten L-Selektin (CD62L), welches über die Bindung zu Adressinen, wie CD34 oder GlyCAM-1 für die Einwanderung der naiven Zellen aus dem Blut in periphere Lymphgewebe sorgt. Hier verbleiben die naiven T-Zellen und warten auf die Präsentation des richtigen Antigens.

Dendritische Zellen, welche als die potentesten APCs bekannt sind, durchwandern nach ihrer Bildung im Knochenmark das periphere Gewebe. Sobald sie hier auf ein Antigen treffen, wird dieses phagozytiert oder durch Makropinacytose aufgenommen und prozessiert. Über afferente Lymphbahnen gelangen sie in die nächstgelegenen Lymphknoten, wo sie reifen und auf T-Zellen treffen. Neben der Präsentation von Antigenen in einem MHC-Komplex bedarf es zur vollständigen Aktivierung der naiven T-Zelle noch eines weiteren costimulierenden Signals, welches ausschließlich von professionellen APC ausgeht. CD80 oder CD86 binden als essentielle Co-stimulatorische Moleküle an das CD28 Molekül auf T-Zellen. Durch dieses costimulierende Signal wird die Bildung autoreaktiver T-Zellen verhindert. Bleibt dieses costimulierende Signal nämlich aus, wie etwa nach einer Antigenpräsentation durch spezialisierte Gewebszellen, so wird die T-Zelle nicht aktiviert, sondern gerät in den Zustand der Anergie oder wird durch Apoptose entsorgt. Ein weiteres wichtiges Signal für die T-Zellreifung geht von den verschiedenen Zytokinen aus, welche von APCs, Gewebszellen, aber auch T-Zellen selbst sezerniert werden.

Nach erfolgter Aktivierung (Priming) beginnen T-Zellen mit der Sekretion von IL-2, welches autokrin ihre klonale Vermehrung stimuliert. Erst nach erfolgter Proliferation differenzieren T-Zellen in ihre verschiedensten Effektorfunktionen oder zu Gedächtniszellen.

1.2.3.2 Charakterisierung von zytotoxischen Effektor T-Zellen

Die verschiedenen Stadien der T-Zellreifung lassen sich anhand der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle genauer untersuchen und definieren. Das eingangs erwähnte L-selectin (CD62L) wird von naiven Zellen expremiert, nicht aber von aktivierten. Daher kann die Abwesenheit seiner Expression als Marker für den Aktivierungsstatus der Zelle herangezogen werden. CD43 ist ein Membran-Sialoglykoprotein, das von allen Lymphozyten expremiert wird und ein Teil eines Ligand-Rezeptorkomplexes ist, der bei der T-Zellaktivierung eine Rolle spielt. Somit dient CD43 als Aktivierungsmarker und lässt sich zur Identifikation von Effektorzellen einsetzen. Außerdem wurde in dieser Arbeit die Expression von CD44 untersucht. Bei diesem Marker handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, welches aufgrund der Aktivierung der T-Zelle hochreguliert wird.

Ob zytotoxische T-Zellen funktionell aktiv sind, lässt sich anhand der Expression und Freisetzung zytotoxischer Moleküle bestimmen. Diese werden nach der Produktion in lytischen Granula der Effektorzellen gespeichert und nach Aktivierung in der Region der zytotoxischen Synapse sezerniert (Granula-Exozytoseweg). Diese lytischen Granula enthalten Granzyme und Perforine (Abbildung 1.6). Bei den Granzymen handelt es sich um Serinproteasen, welche spezifisch die Aminosäure Serin spalten. Menschen expremieren die Granzyme A, B, H, K und M. Mäuse hingegen die Granzyme A-G, K, M und N. Das am besten untersuchte Granzym ist Granzym B (GzmB). Bevor GzmB seine proapoptotische Wirkung entfalten kann, muss es zur entsprechenden Zielstruktur in der Zelle befördert werden. Dies wird durch eine synergistische Wechselwirkung mit Perforin ermöglicht. Hier werden derzeit zwei mögliche Wege diskutiert. Erstens kann Perforin einen kalziumabhängigen Membranschaden verursachen, der es dem GzmB erlaubt passiv in das Zytosol der Zielzelle zu diffundieren. Zweitens wird diskutiert, ob GzmB via endosomaler Vesikel in die Zielzelle gelangt und Perforin hier, mittels eines bislang nicht geklärten Mechanismus an der Freisetzung des GzmBs aus den Endosomen beteiligt ist. Ist GzmB einmal in die Zielzelle gelangt, kann es seine proapoptotische Wirkung entfalten. Derzeit gelten drei verschiedene Wege der intrinsischen Apoptoseinduktion durch GzmB als belegt. GzmB kann einerseits die Spaltung von Bid induzieren, was eine Freisetzung von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Innenraum zur Folge hat. Schließlich kommt es zur Aktivierung der Pro-Caspase-9 und somit zur Induktion einer Enzymkaskade, welche den Abbau der Kernmembran und die Fragmentierung

der DNA zur Folge hat (Effektorkaskade). Diese Kaskade kann außerdem auch direkt durch GzmB aktiviert werden. Dieser Weg gilt allerdings hauptsächlich in Mäusen als belegt. Als dritte Möglichkeit zur Induktion der Apoptose kann GzmB auch direkt Substrate, wie Fillamin oder Gelsolin spalten. Da diese auch Substrate des Effektorkaspasewegs sind, wird dieser durch ihre Spaltung aktiviert (Abbildung 1.6).

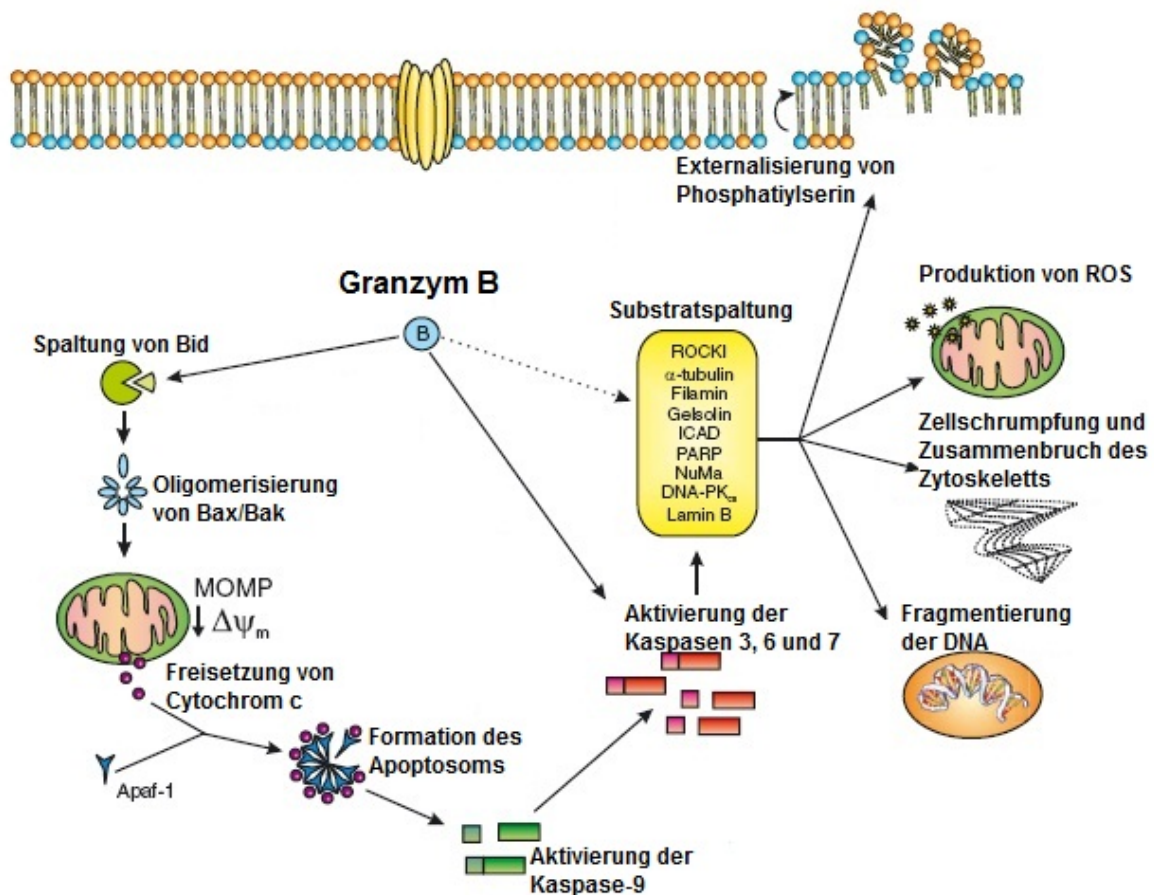


Abbildung 1.6 GzmB vermittelte Apoptoseinduktion.

Dargestellt sind die drei Hauptmechanismen der GzmB vermittelten Apoptoseinduktion. 1. die direkte Spaltung von Bid, 2. Die direkte Aktivierung der Effektor-Kaspasen 3, 6 und 7. die direkte Spaltung intrazellulärer Substrate. Verändert nach (102)

Bei der Fas vermittelten Apoptoseinduktion, wird bei Kontakt einer zytotoxischen T-Zelle (CTL) mit einem Antigen, eine Bindung zwischen dem Fas-Liganden (Fas-L) der CTL und dem Fas Rezeptor auf der Zielzelle hergestellt (Abbildung 1.7) (98). Dies führt zur Trimerisierung von FasL/Fas auf der Zellmembran der Zielzelle und somit zur Formation des DISC (death inducing signaling complex). Nun wird die

intrazelluläre Domäne des Rezeptorkomplexes internalisiert, wodurch es ebenfalls zur Aktivierung von Kaspasen und somit zur Induktion der Apoptose kommt (71).

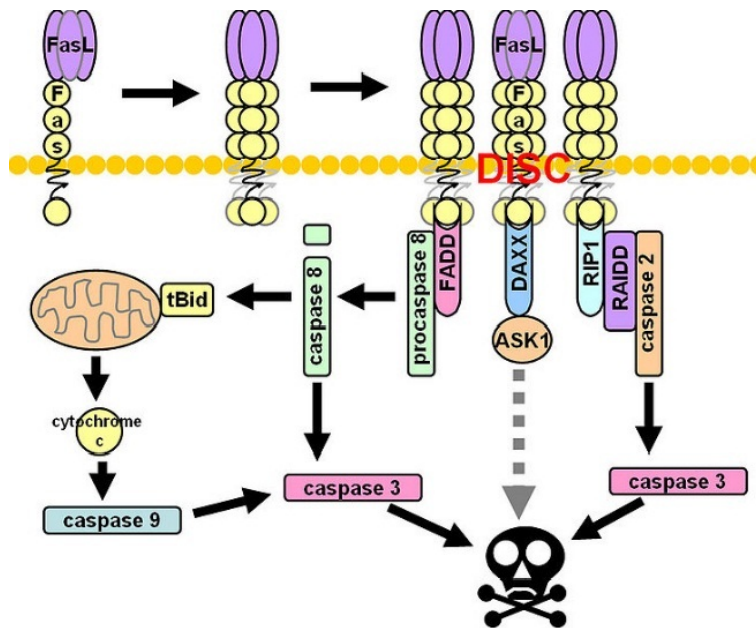


Abbildung 1.7 FasL vermittelte Apoptoseinduktion.

Bindung von FasL an seinen Rezeptor auf der Zielzelle führt zur Formation des DISC, somit zur Internalisierung der intrazellulären Domäne des Fas Rezeptors und schließlich zur Apoptoseinduktion.
http://en.wikipedia.org/wiki/File:Fas_signaling.jpg

Charakteristisch für die Apoptose einer Zielzelle ist die Fragmentierung der chromosomalen DNA in 180 bp lange Mono- und Multimere. Mit diesen Mechanismen werden in einem Wirtsorganismus infizierte Zellen eliminiert.

1.2.3.3 CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T-Zellen, die auch als zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) bezeichnet werden, erfüllen unter anderem die wichtige Aufgabe der Erkennung und Eliminierung Virus-infizierter Zellen. Neben ihrer zytotoxischen Funktion haben sie aber auch eine regulierende Funktion im Immunsystem. CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, IFN- γ und in geringerem Umfang auch TNF- α , sowie eine Reihe weiterer proinflammatorischer Zytokine (z.B.: IL-6, IL-8 und IL-12) zu exprimieren.

Von CD8⁺ T-Zellen sezerniertes IFN- γ kann die Vermehrung von Pathogenen hemmen, indem es eine gesteigerte MHC-I-Expression induziert (35), Makrophagen aktiviert (79) oder die Pathogenreplikation direkt inhibiert (39). Zudem erhöht IFN- γ die Fas-Expression und wirkt dadurch indirekt auf die Apoptose-Induktion (70).

TNF- α besitzt eine starke proinflammatorische Wirkung und ein direktes zytotoxisches Potential. Die Bindung von TNF- α an den TNF-Rezeptor 1 kann, abhängig vom Aktivierungsstatus der Zielzelle deren Zelltod induzieren (109). Außerdem können sie Chemokine synthetisieren, z.B. Macrophage Inflammatory Protein-1 (MIP-1 α , MIP-1 β) oder Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES) (80). Bei der Migration von Leukozyten zum Ort einer Infektion und der Induktion von Entzündungsprozessen in infizierten Organen spielen diese Chemokine eine entscheidende Rolle (62).

1.2.3.4 CD4⁺ T-Zellen

Im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen, denen bereits nach ihrer Differenzierung zur CD8⁺ T-Zelle eine zukünftig zytotoxische Funktion zugeschrieben werden kann, handelt es sich bei CD4⁺ T-Zellen um eine weitaus heterogenere Zellpopulation. Diese Erkenntnis wurde bereits 1986 von Mossman und Coffman publiziert (Th1/Th2 Paradigma), doch handelte es sich bei ihrer Beobachtung nur um zwei der heute sechs grundsätzlich unterscheidbaren Subpopulationen (Abbildung 1.8). Zu nennen sind hier die induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg), die Th17-Zellen, die Th2-Zellen, die Tfh-Zellen, die Th1-Zellen und die zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen. In welche der Subpopulationen sich eine aktivierte CD4⁺ T-Zelle polarisieren wird, ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So spielt eine Rolle, welche Art von APC das Antigen zum „Priming“ präsentiert, wie viel Antigen sie geladen hat und wie lange es der CD4⁺ T-Zelle präsentiert wird. Die entscheidendste Rolle scheint jedoch die Menge und Zusammensetzung der von den APCs produzierten Zytokine zu spielen. Die polarisierten CD4⁺ T-Zellen werden anhand der von ihnen produzierten Effektormediatoren, sowie der Transkriptionsfaktoren unterschieden, die ihr Differenzierungsprogramm einleiten. Diese hohe Diversität drückt sich schließlich auch in der Übernahme der unterschiedlichsten Effektorfunktionen aus. Sehr lange wurde geglaubt, dass ein einmal erfolgter Differenzierungsprozess terminal sei. Diese Meinung wurde in den letzten Jahren revidiert, denn es zeigte sich, dass Effektor CD4⁺ T-Zellen durchaus in der Lage sind zu re-differenzieren, wenn das sie umgebende Zytokinmilieu dies begünstigt.

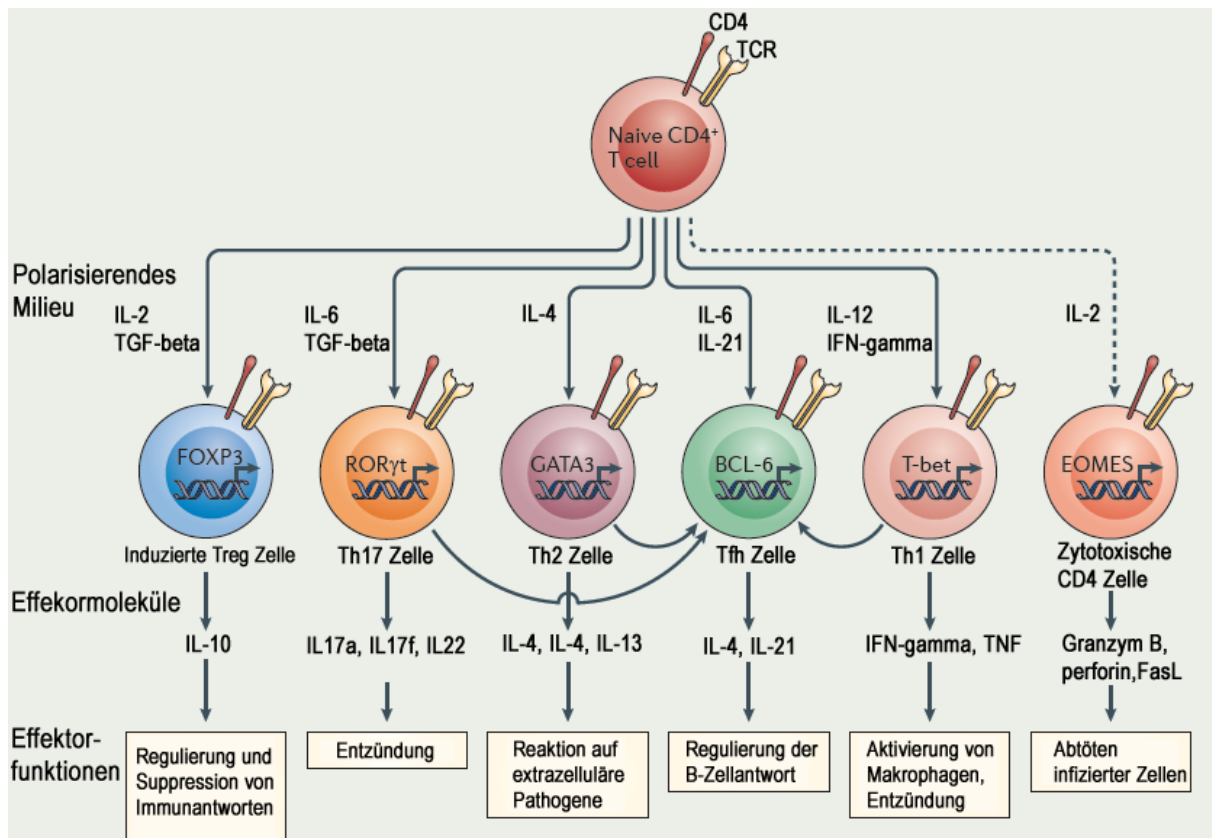


Abbildung 1.8 Definition der CD4⁺ Subpopulationen.

Aufgrund des polarisierenden Milieus können naive CD4⁺ T-Zellen zur Entwicklung in unterschiedliche Subpopulationen angeregt werden. Hierzu werden unterschiedliche Transkriptionsfaktoren induziert und so die Expression verschiedener charakteristischer Effekormoleküle angeregt. Verändert nach (103)

1.2.3.4.1 CD4 Subpopulationen.

1.2.3.4.1.1 Th1-Zellen

Das polarisierende Milieu, das die Entwicklung naiver CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th1 einleitet, besteht hauptsächlich aus den beiden Zytokinen IL-12 und IFN-γ. Hierdurch wird der linienspezifische Transkriptionsfaktor T-bet induziert, welcher unter anderem die Expression der typischen Zytokine IFN-γ und TNF-α steuert. Th1-Zellen gelten als wichtige Mediatoren der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, wie Mycobakterien und Viren. Die wichtigste Funktion von Th1-Zellen ist die Induktion einer starken proinflammatorischen, zellulären Immunantwort. Das wichtigste Zytokin dieser CD4 Subpopulation ist IFN-γ, welches das zytotoxische Potential von NK-Zellen und zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen erhöht und deren Proliferation veranlasst. Neben diesen Helferfunktionen können die produzierten Zytokine IFN-γ und TNF-α

aber auch direkte antivirale Aktivität haben, wie für verschiedene Modelle von Virusinfektionen gezeigt werden konnte (72).

1.2.3.4.1.2 Th2-Zellen

Th2-Zellen vermitteln die Immunantwort gegen extrazelluläre Parasiten einschließlich Helminthen und werden durch das Zytokin IL-4 polarisiert. Der entscheidende Transkriptionsfaktor heißt GATA-3. Ursprünglich wurden Th-2 Zellen dem humoralen Immunsystem zugeschrieben, da sie die Proliferation von B-Zellen stimulieren, den Klassenwechsel in B-Zellen induzieren, sowie die Produktion von neutralisierenden Antikörpern verstärken. Zu diesem Zweck produzieren sie die Effektorzytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13. Die Festlegung von Th2-Zellen auf das humorale Immunsystem ist jedoch durch Zelltransferexperimente, in denen entweder Th1- oder Th2-Zellen transferiert wurden, in Frage gestellt worden, da in beiden Fällen eine deutliche IgG Antikörperantwort induziert werden konnte.

1.2.3.4.1.3 Zytotoxische CD4⁺ T-Zellen

Erst in jüngster Zeit hat sich in der Immunologie die Definition einer weiteren CD4⁺ T-Zellpopulation etabliert. Obwohl eine direkte zytotoxische Funktion von CD4⁺ T-Zellen seit langem beobachtet und beschrieben wurde, wurden diese Zellen eher der Th-Population zugeschrieben. Entscheidend für die Benennung einer eigenen zytotoxischen T-Zellpopulation war die Entdeckung des Transkriptionsfaktors Eomes, welcher die Polarisierung der naiven CD4⁺ T-Zelle zu einer zytotoxischen CD4⁺ T-Zelle induziert. Eomes wiederum wird von den membranständigen ko-stimulatorischen Rezeptoren CD134 (OX40) und CD137 (4-1BB) induziert. Dieser Mechanismus ist bereits von CD8⁺ T-Zellen bekannt. Nun konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit CD134 und CD137 Agonisten zumindest in vitro eine Polarisierung in Richtung zytotoxischer CD4⁺ T-Zellen erfahren und mit der Expression von GzmB, Perforin und FasL beginnen (82).

Abbildung 1.9 zeigt die drei wichtigsten derzeit diskutierten antiviralen Funktionen zytotoxischer CD4⁺ T-Zellen. Nachdem die CD4⁺ T-Zellen durch Antigenpräsentation in Lymphknoten aktiviert wurden, wandern sie zur Infektionsquelle, erkennen dort Antigene auf professionellen APCs und beginnen mit der Sekretion von Effektorzytokinen, welche im Folgenden verschiedene Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems rekrutieren (Abbildung 1.9A).

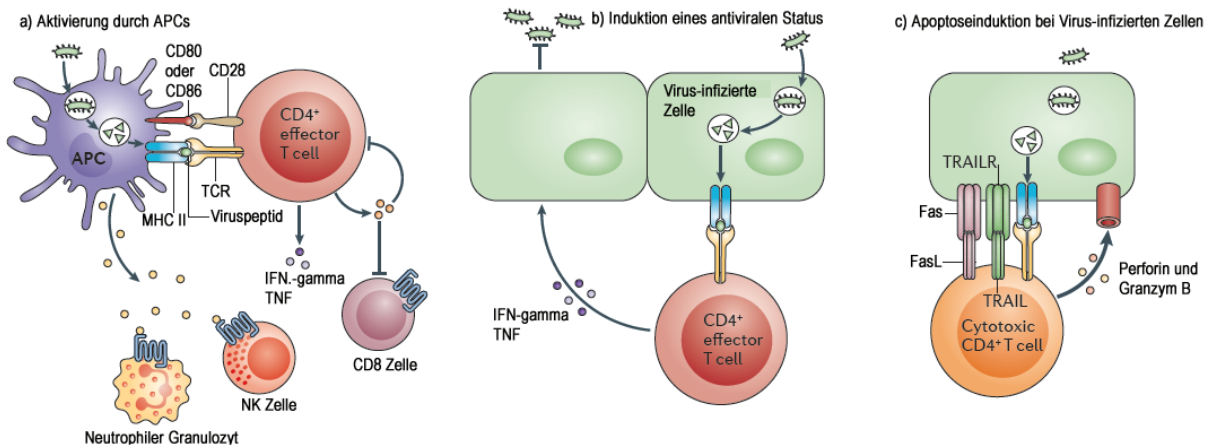


Abbildung 1.9 Antivirale Funktionen von CD4⁺ T –Zellen.

A) Effektor CD4⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die von APCs präsentiert werden. Dies veranlasst die Effektorzellen zur Sekretion verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine. Hierdurch werden gewebsständige APCs aktiviert und Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems rekrutiert. B) Induktion eines antiviralen Status in gesunden Zellen eines infizierten Gewebes durch IFN-γ und TNF Sekretion einer Effektor CD4⁺ T-Zelle. C) Apoptoseinduktion einer infizierten Zelle durch direkte zytotoxische Mechanismen einer Effektor CD4⁺ T-Zelle. Verändert nach (103)

Bei den beiden anderen Mechanismen binden die Effektor CD4⁺ T-Zellen an virale Epitope, die von virusinfizierten Zellen präsentiert werden. In diesem Falle können sie einerseits einen antiviralen Status in den Nachbarzellen induzieren (Abbildung 1.9B), indem sie Effektorzytokine wie IFN-γ und TNF sezernieren oder sie können die infizierten Zellen direkt abtöten (Abbildung 1.9C), indem sie ihre lytischen Granula sezernieren oder rezeptorvermittelt die Apoptose induzieren.

1.2.3.4.1.4 Natürliche regulatorische T-Zellen

Die Population der natürlichen regulatorischen T-Zellen ist in der Abbildung 1.8 nicht dargestellt, weil sie nicht durch Antigenkontakt im Lymphknoten polarisiert wird, sondern bereits im Thymus die charakteristischen Marker Foxp3 und CD25 expremiert. Foxp3 ist ein zur Forkhead-Familie gehörender Transkriptionsrepressor, der zumindest in der Maus nur in regulatorischen T-Zellen spezifisch gebildet wird. Retroviraler Gentransfer von Foxp3 führt zur Differenzierung von regulatorischen T-Zellen aus naiven T-Zellen (45). CD25 ist ebenfalls ein wichtiger Oberflächenmarker dieser Zellpopulation. Hierbei handelt es sich um die alpha-Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) (90). Da CD25 jedoch auch von Effektor T-Zellen nach Aktivierung expremiert wird, kann CD25 nicht als spezifischer Marker für regulatorische T-Zellen

herangezogen werden. Außerdem werden natürliche Tregs auch durch den Marker Helios, ein Transkriptionsfaktor der Ikaros Familie definiert. Natürliche Tregs machen ca. 5-10% aller $CD4^+$ T-Zellen aus. Mäuse, die diese Zellen nicht besitzen, entwickeln eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen, was ihre Funktion und Relevanz verdeutlicht (10). Natürliche regulatorische T-Zellen haben eine supprimierende Wirkung auf das Immunsystem und sorgen somit für die Aufrechterhaltung des Immungleichgewichts und für Toleranz. Allerdings konnte ein universeller Mechanismus der Suppression durch regulatorische T-Zellen bisher nicht gefunden werden. Eine Hypothese besagt, dass die suppressive Wirkung abhängig ist von einem Zell-Zell-Kontakt. Hier kommt es zur Bindung zwischen dem CTLA4 Molekül auf der Oberfläche der Tregs und den CD80- und CD86 Rezeptoren auf den Effektor T-Zellen. Für diese Hypothese spricht, dass Zellen, die diese Rezeptoren nicht besitzen, resistent sind gegenüber der Suppression durch Tregs. Für die HIV Infektion wurde kürzlich ein weiterer Zellkontaktabhängiger Mechanismus beschrieben, der zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und das Ektoenzym CD39 beinhaltet (91). Weiterhin wird spekuliert, ob die supprimierende Wirkung auf der Sekretion antiinflammatorischer Zytokine, wie TGF- β oder IL-10 beruht. Diese könnten entweder in unmittelbarer Nähe zu den Effektorzellen von den Tregs selbst sezerniert werden, oder Tregs induzieren deren Sekretion durch APCs. Zahlreiche Viren machen sich den immunsuppressiven Effekt der regulatorischen T-Zellen zunutze. Man spricht dann von „Immunescape-Mechanismen“. So konnte in vitro gezeigt werden, dass FV-, sowie HIV infizierte DCs die Expansion von Tregs induzieren (11, 18). Auf diese Weise wird die antivirale CTL Antwort supprimiert und es kommt zur Etablierung einer chronischen Infektion. Besonders deutlich wird dies im FV Mausmodell. Zumindest in diesem Modell konnte klar belegt werden, dass Tregs nicht FV-spezifisch sind (7). Zudem konnte für die LCMV Infektion gezeigt werden, dass ein Teil der Treg-Population als Antwort auf ein endogenes retrovirales Superantigen expandiert (81).

1.2.3.4.1.5 Induzierte regulatorische T-Zellen

Im Gegensatz zu natürlichen regulatorischen T-Zellen, stammen induzierte regulatorische T-Zellen von naiven Th-Zellen ab und sind zunächst $CD25^-$ und $Foxp3^-$. In in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen bei gleichzeitigem TCR Stimulus und TGF- β Gabe dazu führt,

dass sich diese Zellen zu regulatorischen T – Zellen entwickeln. Diese Subpopulation wurde in verschiedenen Tumor- und Infektionsmodellen beschrieben (67). Induzierte Tregs werden weniger anhand von Markern identifiziert, als vielmehr anhand von Signaturzytokinen, wie TNF- α und IL-10 (66).

1.3 Das DEREK Mausmodell

Das DEREK Mausmodell (**d**epletion of **r**egulatory **T** cell) wurde im Jahr 2007 mit Hilfe der künstlichen bakteriellen Chromosomentechnologie (bacterial artificial chromosome, BAC) generiert. In diesem Modell wird ein Diphtherietoxinrezeptor/GFP (green fluorescent protein)-Fusionsprotein unter der Kontrolle des Foxp3 Promotors expremiert. Da Foxp3 ausschließlich von Tregs expremiert wird, ermöglicht es dieser transgene Mausstamm, regulatorische T-Zellen über das expremierte GFP eindeutig zu detektieren und außerdem durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) selektiv zu depletieren (57) (Abbildung 1.10). Da eine kontinuierliche Diphtherietoxinbehandlung neugeborener DEREK-Mäuse über sechs Tage zu einer Autoimmunerkrankung führte, welche durch autoaggressive T-Zellen verursacht wurde, konnte experimentell nachgewiesen werden, dass Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen maßgeblich an der Homöostase des Immunsystems beteiligt sind und den Organismus vor der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten bewahren (57).

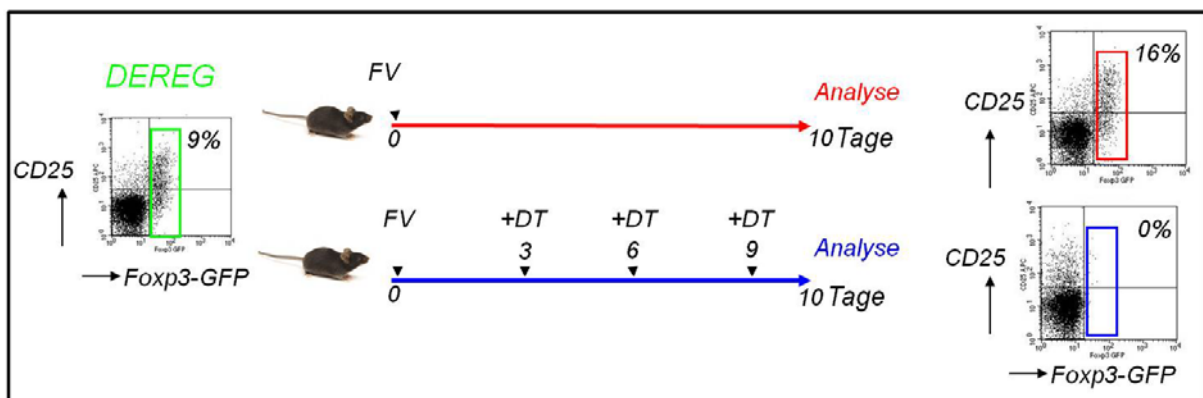


Abbildung 1.10 Selektive Depletion regulatorischer T-Zellen in DEREK Mäusen.

Links gezeigt ist ein typischer FACS Dot-Plot, mit den Treg Markern CD25 und Foxp3-GFP. Anhand dieses Modells kann die Expansion in Folge der FV-Infektion durchflusszytometrisch verfolgt werden (oben rechts). Nach dreimaliger Depletion dieser Zellen mit Diphtherietoxin im Abstand von drei Tagen, können Tregs für mehrere Tage selektiv aus dem System entfernt werden (unten rechts).

1.4 Immunreaktion auf eine Friend Virus-Infektion

1.4.1 Die Kinetik der Friend Virus-Infektion und der beteiligten Immunzellen

Während der akuten FV-Infektion ist die Viruslast im Knochenmark am höchsten, gefolgt von Milz und Lymphknoten. In allen drei Organen wurde der Höchstwert der Viruslast an Tag 7 nach Infektion nachgewiesen. Etwa zu diesem Zeitpunkt beginnen die virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen mit Effektorphänotyp und zytolytischem Potential zu expandieren. Die maximale Aktivierung dieser CD8⁺ Effektor T-Zellen und die maximale Produktion zytotoxischer Moleküle durch diese Zellen erfolgt an Tag 10, was deutlich mit der abnehmenden Viruslast korreliert. An Tag 10 nach Infektion ist die Viruslast so stark gesunken, dass es zu einer Kontraktion des CD8⁺ Effektor T-Zellpools kommt. Dennoch ist in der chronischen Phase eine Population von virusspezifischen Zellen mit Effektorphänotyp nachweisbar, die allerdings ihre Fähigkeit, Granzyme zu produzieren und zu degranulieren verloren hat. Die Expansion von Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen erfolgt in allen untersuchten Organen in der zweiten Woche der Infektion und korrelierte mit der Höhe der Viruslast und somit auch mit der Stärke der CD8⁺ T-Zellantwort. So konnte in den Lymphknoten, dem Organ mit der geringsten Viruslast, auch nur die schwächste Expansion von Tregs nachgewiesen werden. Im Knochenmark hingegen, dem Organ mit der größten Viruslast während der akuten Infektion, konnte auch die stärkste Expansion von Tregs nachgewiesen werden. Dies belegt, dass die Suppression der CD8⁺ T-Zellen durch expandierende regulatorische T-Zellen lokal definiert ist (115). Während der chronischen Infektion ist der Virustiter stark gesunken, hier findet sich der höchste Titer in den Lymphknoten, gefolgt von Milz und Knochenmark, wobei die CD8⁺ T-Zellpopulation weiter kontrahiert ist.

1.4.2 Die Rolle von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion

Die akute Phase der FV-Infektion wird durch die zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen dominiert. Dies wird deutlich, da resistente C57BL/6 Mäuse in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen die Infektion nicht kontrollieren können (41). Das virale Epitop, welches hauptsächlich von CD8⁺ T-Zellen erkannt wird, ist ein Aminosäuresequenzabschnitt des F-MuLV GagL-Proteins (21). Die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen drückt sich in den Mechanismen Sekretion von IFN- γ , Fas/FasL Interaktion oder der Produktion und Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen

(Perforin, Granzym A und Granzym B) aus und korreliert dabei direkt mit dem Rückgang der Splenomegalie (112). Durch die Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen kommt es zur Induktion der Apoptose in Virus-infizierten Zielzellen. Trotz der durch die CD8⁺ T-Zellen vermittelten Kontrolle der akuten Infektion kann das Virus auch in hoch resistenten Mausstämmen nicht vollständig eliminiert werden. Es lassen sich zwar während der chronischen Infektion FV-spezifische CD8⁺ T-Zellen nachweisen, diese sind jedoch in ihrer Funktion eingeschränkt und können keine funktionsfähigen lytischen Granula produzieren. Außerdem ist ihre Fähigkeit, verschiedene Zytokine wie z.B. IFN- γ zu sekretieren, stark eingeschränkt (117). Im Gegensatz zu der akuten Infektion, sind CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Phase somit nicht in der Lage, das persistierende Virus zu kontrollieren oder zu eliminieren. Eine CD8⁺ T-Zelledpletion während der chronischen Phase der Infektion hat daher keinerlei Effekt auf die Höhe der Viruslast (42).

1.4.3 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen während einer Friend Virus-Infektion

Die oben beschriebene Effektorfunktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen erreicht ihren Höhepunkt an Tag 10 nach Infektion. Zu diesem Zeitpunkt erreicht auch die Expansion regulatorischer T-Zellen (Treg) ihren Höhepunkt. Die beschriebene Expansion von Tregs ist zumindest in der FV-Infektion lokal begrenzt und nicht virusspezifisch (114). Tregs expandieren besonders in Bereichen mit hoher Viruslast. CD8⁺ T-Zelldepletionsexperimente haben jedoch gezeigt, dass dies ein indirekter Effekt ist. Akut infizierte Tiere, deren CD8⁺ T-Zellen depletiert werden, zeigen eine deutlich geringere Expansion von Tregs. Daraus kann geschlossen werden, dass die Viruslast die Expansion der CD8⁺ T-Zellen induziert und diese ihrerseits die Expansion der Tregs (114). Die selektive Depletion von Tregs mit Hilfe des DEREK Mausmodells (siehe Abschnitt 1.3) zeigt in der akuten Infektion einen direkten Zusammenhang zwischen dem fortschreitenden Funktionsverlust von CD8⁺ T-Zellen während der späten Phase der akuten FV-Infektion und der Expansion von Tregs. Die Depletion von Tregs resultiert hier in einer signifikanten Zunahme der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen und einer signifikanten Abnahme der Viruslast (115). Diese Ergebnisse belegen, dass regulatorische T-Zellen die Expansion und Funktion von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in der Phase der akuten retroviralen Infektion supprimieren und die Vermutung liegt nahe, dass dies auch für

die Effektorfunktion der CD4⁺ T-Zellpopulation in Betracht gezogen werden muss. So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Treg Depletion die Reaktivierung IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Zellen in der späten Phase der akuten FV-Infektion induziert (41). Anhand der Depletionsversuche konnte außerdem gezeigt werden, dass die Suppression der CD8⁺ T-Zellantwort in vivo eine entscheidende Rolle für die Immunevasion des Virus spielt. Der Beginn der Dysfunktion der CTL korreliert also mit dem Höhepunkt der Expansion regulatorischer T-Zellen, was mit hoher Wahrscheinlichkeit zu der Etablierung viraler Persistenz beiträgt (116). Die Depletion von Tregs während der chronischen Phase der Infektion führt zu einer Expansion FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, sowie einer Reaktivierung bereits dysfunktional gewordener CD8⁺ T-Zellen (24). Dies hat einen positiven Einfluss auf die Viruslast.

1.4.4 CD4⁺ T-Zellen in der Friend Virus Infektion

Der erste Hinweis für die Wichtigkeit von CD4⁺ T-Zellen in der FV-Infektion wurde durch CD4 Depletionsexperimente erzielt. Es zeigte sich, dass dies Auswirkungen auf den Verlauf sowohl der akuten, wie auch der chronischen Infektion zur Folge hatte (72, 85). Während durch die CD4 Depletion in der akuten Phase der FV-Infektion Einschränkungen in der Funktionalität von CD8⁺ T-Zellen, sowie der Sekretion von Antikörpern durch B-Zellen zu beobachten sind, führt die CD4 Depletion in der chronischen Phase zu einem Kontrollverlust über die Viruslast.

1.4.4.1 CD4⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion

Die akute Phase der FV-Infektion ist wie oben beschrieben hauptsächlich durch die in den ersten beiden Wochen massiv expandierenden zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen kontrolliert (116). Eine Depletion von CD4⁺ T-Zellen während der akuten Infektionsphase resultiert in einer massiven Abnahme FV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, sowie CD8 Memory Zellen (72). Weiterhin verursachte die CD4 T-Zelldepletion eine Reduktion der neutralisierenden Antikörper, sowie eine Zunahme des Virustiters, mit einer darauf folgenden Splenomegalie (72). Diese Befunde werden untermauert durch die Erkenntnis, dass zum Zeitpunkt der maximalen Immunantwort, also um Tag 10 nach Infektion, beinahe 40% der virusspezifischen CD4⁺ T-Zellen phänotypisch der Tfh Population zugeordnet werden können (77). Da diese Zellpopulation hauptsächlich mit der antigenspezifischen Aktivierung von naiven oder Gedächtnis-B-Zellen assoziiert ist, führt eine Depletion unweigerlich zu einer Reduktion neutralisierender Antikörper.

Grundsätzlich wird zunehmend auch eine direkte zytotoxische Funktion von Th1-Zellen in viralen Infektionen, z.B.: Herpes simplex (47) oder Influenza (15) diskutiert. Auch in der Friend Virus Infektion konnte nach Transfer von TCR transgenen CD4⁺ T-Zellen in akut infizierte Mäuse eine Expansion dieser Zellen bei gleichzeitiger Expression von IFN- γ , sowie einer Abnahme des Virustiters beobachtet werden (72). Limitiert wird diese Funktion jedoch durch die Tatsache, dass die MHC-II-Expression fast ausschließlich auf APCs beschränkt ist. Erythroide Ter119⁺ Zellen, welche in der akuten Infektionsphase das Hauptvirusreservoir darstellen, exprimieren keine MHC-II Moleküle. Bisher konnten zwei CD4 T-Zellepitope identifiziert werden, welche sich beide von dem F-MuLV gp70 Env Molekül ableiten.

1.4.4.2 CD4⁺ T-Zellen in der chronischen FV-Infektion

Die chronische FV-Infektion ist durch die Erschöpfung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen gekennzeichnet, sowie einer Zunahme an Tregs (24). Erstaunlicherweise bleibt aber trotz der Dysfunktionalität der CTLs der Virustiter auf einem relativ niedrigen und konstanten Level. Es wird vermutet, dass dies durch die direkte antivirale Aktivität von CD4⁺ T-Zellen erreicht wird, welche aufgrund der nun nicht mehr vorhandenen Überlagerung mit der zytotoxischen CD8 T-Zellantwort deutlicher werden kann. Genährt wird diese These durch die Tatsache, dass die FV-Zielzellen in der chronischen Infektion nicht länger die erythroiden Ter119⁺ Vorläuferzellen sind, sondern B-Zellen, welche im Gegensatz zu den Vorläuferzellen sehr wohl MHC-II Komplexe exprimieren können und somit direkt durch CD4⁺ T-Zellen angreifbar werden. Depletionsexperimente in persistent FV-infizierten Tieren zeigten keinen Effekt für die CD8⁺ T-Zelldepletion und einen drastischen Effekt nach der CD4⁺ T-Zelldepletion. Hier kam es zu Splenomegalien und erythroiden Leukämien (42). Allerdings wurden diese Ergebnisse mit einem LDV verunreinigten FV Stock erzielt und sind daher mit Vorsicht zu bewerten.

1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Frühere Publikationen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Helferfunktion der $CD4^+$ T-Zellen während der akuten FV-Infektion unerlässlich für die Induktion von Gedächtnis $CD8^+$ T-Zellen und der B-Zellvermittelten Antikörperantwort ist. Diese Ergebnisse wurden allerdings mit TCR transgenen $CD4^+$ T-Zellen erzielt, die nach Transfer in FV-infizierte Mäuse untersucht wurden und geben somit nur bedingt die physiologische Situation endogener Immunzellen wieder. Außerdem konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Effektor $CD4^+$ T-Zellen nach Depletion von Tregs in der Lage sind, die zytotoxische Funktion von $CD8^+$ T-Zellen zu übernehmen und Tumorzellen abzutöten. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der $CD4^+$ Effektor T-Zellantwort nach FV-Infektion. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf der Analyse des zytotoxischen Potentials endogener $CD4^+$ T-Zellen, sowie deren Regulation durch Tregs und $CD8^+$ T-Zellen liegen. FV-spezifische $CD4^+$ T-Zellen sollten mittels Tetramerfärbung definiert und anschließend detailliert phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Da mittels der Tetramer-Technik nur die $CD4^+$ Zellen detektiert werden können, die spezifisch für nur eines von mehreren viralen Antigen sind, sollte der Phänotyp von Tetramer-positiven virusspezifischen $CD4^+$ T-Zellen auf die gesamte $CD4^+$ Subpopulation übertragen und kinetisch und funktionell charakterisiert werden. Es sollte die Zytokinproduktion, sowie die Expression zytotoxischer Moleküle in der akuten, sowie der chronischen FV-Infektion analysiert werden. Die funktionelle Rolle der Tregs bei der Regulation der Effektor $CD4^+$ T-Zellantwort sollte durch Depletion von Tregs in dem DREG Mausmodell untersucht werden. Zudem sollten $CD8^+$ T-Zellen in der akuten FV-Infektion depletiert werden, um Aufschluss über deren Auswirkung auf die FV-induzierte Effektor $CD4^+$ T-Zellpopulation zu bekommen.

Insgesamt dienten diese Arbeiten dem Zweck, das funktionelle Potential von $CD4^+$ T-Zellen während einer retroviral induzierten Immunantwort zu untersuchen. Weiterhin galt es, die Regulation dieses Potenzial besser zu verstehen, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob eine Manipulation dieses Systems eine Möglichkeit darstellt, die akute und die chronische Virusinfektion effizient zu behandeln.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1 Verwendete Geräte

| Geräte | Hersteller |
|--|---|
| <i>Air Clean 600 PCR Workstation</i> | <i>STARLAB, Ahrensburg</i> |
| <i>CO₂ Brutschrank</i> | <i>Hund, Wetzlar</i> |
| <i>Durchflusszytometer LSR II</i> | <i>Thermo, Dreieich</i> |
| <i>Gefrierschrank</i> | <i>Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg</i> |
| <i>Heizblock</i> | <i>LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen</i> |
| <i>Kühlschrank</i> | <i>Grant, Cambridge (UK)</i> |
| <i>Manuelle Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl)</i> | <i>LIEBHERR Comfort, Ochsenhausen</i> |
| <i>Neubauer-Zählkammer</i> | <i>Eppendorf, Hamburg</i> |
| <i>Pipettierhilfe Accu-Jet Pro</i> | <i>BD, Heidelberg</i> |
| <i>Standgefrierschrank</i> | <i>Brand, Wertheim</i> |
| <i>Waage Scout Pro</i> | <i>SANYO, Wiesloch</i> |
| <i>Wärmelampen</i> | <i>Ohaus, Kirchheim</i> |
| <i>Werkbank</i> | <i>Philips, Amsterdam</i> |
| <i>Werkbank Herasafe</i> | <i>KOJAIR[®], Meckenheim</i> |
| <i>Zentrifuge 5415C</i> | <i>Heraeus, München</i> |
| <i>Zentrifuge Avanti J-26XPi</i> | <i>Eppendorf, Hamburg</i> |
| <i>Zentrifuge Biofuge fresco</i> | <i>Beckman Coulter, Krefeld</i> |
| <i>Zentrifuge Megafuge 1.0R</i> | <i>Heraeus, München</i> |
| <i>Zentrifuge Rotina, 420</i> | <i>Heraeus, München</i> |
| | <i>Hettich, Mülheim a.d.Ruhr</i> |

2.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.2 Verwendete Materialien

| Material | Hersteller |
|---|--|
| 2 ml Einmalspritzen | BD, Heidelberg |
| Bechergläser | Schott, Mainz |
| Erlenmeyerkolben | Schott, Mainz |
| FACS-Röhrchen | BD, Heidelberg |
| Flachbodenplatte (96-well) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Kanülen (G23, G25) | BD, Heidelberg |
| Parafilm | American National Can, Chicago (USA) |
| Pinzetten | Braun, Tuttlingen |
| Pipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µl) | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettenspitzen, steril (10, 20, 100, 200, 1000 µl) | STARLAB, Ahrensberg |
| PP-Schraubverschlussröhrchen, steril (15 ml, 50 ml) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäß (1,5 ml; 2 ml) | Eppendorf, Hamburg |
| Scheren | Braun, Tuttlingen |
| Zellkulturflaschen, steril (T25, T75, T175) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Zellkulturplatte, steril (6-well, 12-well, 24-well) | Greiner bio-one, Frickenhausen |
| Zellsiebe | Falcon BD, Heidelberg |
| Zentrifugenröhrchen | Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Rochester (USA) |

2.3 Versuchstiere

2.3.1 Wildtyp Mäuse

| | |
|-----------------|---|
| Balb/c : | Resistenzgene: $H-2D^{d/d}$, $Fv-2^{s/s}$ Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland |
| C57BL/6: | Resistenzgene $H-2D^{b/b}$, $Fv-2^{r/s}$ Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland |

2.3.2 Transgene Mäuse

| | |
|---------------|--|
| DEREG: | Resistenzgene $H-2D^{b/b}$, $Fv-1^{b/b}$, $Fv-2^{r/r}$ eigene Zucht, Zentrales Tierlabor, Universitätsklinikum Essen |
|---------------|--|

Alle Tiere waren zum Versuchsbeginn mindestens acht Wochen alt. Alle Mäuse stammen aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage. Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche unter SPF-Bedingungen gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter. Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association“ durchgeführt. Die Mäuse am Universitätsklinikum Essen wurden unter tierärztlicher Kontrolle gezüchtet und gehalten. Die Würfe der transgenen Mauslinie wurden innerhalb der ersten sechs Lebenswochen genotypisiert.

2.4 Chemikalien und Medien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien und Medien von den Firmen Applichem (Darmstadt), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (München) bezogen.

3-Amino 4-Ethylencarbazol (AEC), autoMACS Lauf- und Waschpuffer (Miltenyi Biotec), β -Mercaptoethanol, BSA (Rinderserumalbumin), Chloroform, Diphtherietoxin, DMEM-Medium, Dextrose, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Essigsäure, Ethanol, FACS Clean (BD), FACS Flow (BD), FACS Rinse (BD), FCS (Fötale Kälberserum (Biochrom KG)), Formalin (8%; 40 %), Glucose, Glycerin, Hepes, Hexadimethrin-Bromid (Polybren A), Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Kalziumchlorid, L-Glutamin, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumchlorid,

Natriumhydrogencarbonat, Natriumpyruvat, Natronlauge, N-N-Dimethylformamid, o-Phenolrot, Percoll, Pikrinsäure, Polyethylenglycol, RPMI-Medium, Salzsäure, Schwefelsäure, TRIZOL[®], Trypanblau, Trypsin, Tween 20, Wasserstoffperoxid, Zitronensäure

2.5 Antibiotika

Penicillin-Streptomycin

Invitrogen, Karlsruhe

2.6 Häufig verwendete Puffer und Medien

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit zweifach destilliertem H₂O angesetzt.

Tabelle 2.3 Puffer und Medien

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|--|---|
| AEC-Gebrauchslösung | AEC-Stock-Lösung wurde 1:20 in 0,05 M Natriumacetat angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 µl 30% H ₂ O ₂ /ml Lösung gestartet |
| AEC-Stocklösung (4 mg/ml) | 20 AEC-Tabletten in 100 ml N-N-Dimethylformamid gelöst |
| Bouin's Lösung | 75ml gesättigte Pikrinsäure 25 ml 40% neutrales Formalin 5 ml Essigsäure |
| Beschichtungspuffer (coating buffer) für intrazelluläre Zytokinfärbungen | 0,05 M Natriumcarbonat pH 9,6 |
| Einfriermedium | 20 ml FCS 10 ml Dimethylsulfoxid 20 ml RPMI 1640 |
| FACS-Puffer | PBS 0,1 % BSA 0,02 % Natriumazid |
| Medium für Mus dunni Zellen | RPMI 1640 |

PBBS

10 % FCS

0,5 % Penicillin/Streptomycin

1 l PBS

1 g Glukose

2.7 Antikörper

Die Antikörper (AK) wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von Becton, Dickinson and Company oder eBioscience bezogen.

Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper

| Antikörper | Klon |
|---|----------------------|
| AK 34; monoklonaler Maus anti-MuLV p15 (Isotyp IgG _{2b}) | |
| AK 720; monoklonaler Maus anti-MuLV env (Isotyp IgG _{2b}) | |
| CD25-APC/PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK | PC61.5 |
| CD43-FITC/PE monoklonaler Ratte anti Maus AK | PC61 |
| CD4-AF700; monoklonaler Ratte anti Maus AK | 1B11 |
| CD62L-PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK | RM4-5 |
| CD8a-eF450/FITC/PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK | H1.2F3 |
| CD44-APC monoklonaler Ratte anti Maus AK | IM7 |
| Foxp3- FITC; monoklonaler Ratte anti Maus AK | FJK-16s |
| Foxp3- PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK | NRRF-30 |
| GzmB-APC; monoklonaler Maus anti Human [Invitrogen] | 53-6.7 |
| Mac-1 (CD11b)-FITC; monoclonal rat anti-mouse antibody | WT.5 |
| IFN-γ-FITC/APC; monoklonaler Ratte anti Maus AK | XMG1.2 |
| Meerrettichperoxidase gekoppelter Ziege anti Maus Ig [Dako] | JES6-5H4 |
| Ter119-PE; monoklonaler Ratte anti Maus AK | MP6-XT22 |
| TNF-α-PeCy7; monoklonaler Ratte anti Maus AK | 24G2 |
| IL-2-eF450 ; monoklonaler Ratte anti Maus AK | JES6-5H4 |
| IL-4 eF450 ; monoklonaler Ratte anti Maus AK | eBio17B7 |
| CD137 | LOB12.3 Bioxcell) |

Tabelle 2.5 Charakterisierung der Fluorochrome

| Bezeichnung | Abkürzung | Absorption (nm) | Emission (nm) |
|---------------------------------------|-----------|-----------------|---------------|
| Fluoresceinisothiocyanat | FITC | 488 | 525 |
| R-Phycoerythrin | PE | 488 | 575 |
| Propidiumiodid | PI | 488 | 615 |
| Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex | PerCP | 488 | 670 |
| Phycoerythrin-Cy7 | PeCy7 | 488 | 785 |
| Allophycocyanin | APC | 633 | 660 |
| Alexa Fluor 700 | AF 700 | 635 | 723 |
| eFluor 450 | eF450 | 405 | 455 |
| 7-Aminoactinomycin D | 7AAD | 488 | 647 |

2.8 Tetramere und F-MuLV-spezifische Peptide

APC markierte MHC Klasse II I-A^b Tetramere beladen mit dem I-A^b restringierten F-MuLV env CD4⁺ Epitop (H19-Env; EPLTSLTPRCNTAWNRLKL). MHC Klasse II Tetramere wurden von der NIH Tetramer Facility (Emory University, Atlanta) zur Verfügung gestellt.

2.9 Kommerzielle Standardtests

Tabelle 2.6 Verwendete Standardtests

| Standardtests | Bezugsquelle |
|--|-------------------------------------|
| Cytofix/Cytoperm Intracellular staining kit | BD Pharmingen, Heidelberg |
| FITC BrdU Flow Kit | BD Pharmingen, Heidelberg |
| Foxp3 staining Set | eBioscience, San Diego, USA |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatory T cell Isolation Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA |
| CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit | Invitrogen, Freiburg |

2.10 Viren und Zelllinien

Friend Retrovirus Komplex: (27)

Die verwendeten FV-Präparationen wurden aus infizierten Mäusen gewonnen (siehe 3.3.).

Friend Murine Leukämie Virus (Helfer-Virus): (27)

Die verwendete Helfer Virus Präparation wurde von Mus dunni Zellen produziert (siehe 3.4).

Tabelle 2.7 Verwendete Zelllinien

| Zelllinie | Bezugsquelle |
|------------------|---|
| <i>Mus dunni</i> | <i>Murine Fibroblasten Zelllinie (58)</i> |
| 169.4 | <i>Die Hybridomazelllinie 169.4 produziert den monoklonalen Ratten IgG_{2b} anti Maus anti CD8 Antikörper (20).</i> |
| 191.1 | <i>Die Hybridomazelllinie 191.1 produziert den monoklonalen Ratten IgG_{2b} anti Maus anti CD4 Antikörper</i> |

3 Methoden

3.1 Tierversuche

Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association“ durchgeführt.

3.1.1 Infektion

Zur Infektion der Mäuse mit dem Friend Virus wurde der Virusstock mit sterilem PBS verdünnt. Für die Untersuchung der akuten FV-Infektion wurde den Mäusen 20.000 SFFU (Spleen Focus Forming Units) pro Tier injiziert, für chronische FV-Infektionen wurden 40000 SFFU FV + 200000 FFU (Focus Forming Units) pro Maus injiziert. Es wurden 500 µl der jeweiligen Verdünnung pro Maus mit einer G25-Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene injiziert.

3.1.2 Intraperitoneale Injektion

Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in DEREK-Mäusen wurde diesen Tieren jeweils 0,5 µg Diphtherietoxin verdünnt in 500 µl endotoxinfreiem H₂O in die Bauchhöhle (intraperitoneal, i.p.) injiziert. Die Injektion erfolgte drei Mal im Abstand von drei Tagen, wobei die letzte Injektion einen Tag vor Versuchsdurchführung erfolgte.

Für die Depletion von CD8⁺ T-Zellen wurde den Tieren 500 µl des zellfreien Überstands einer Hybridoma Zelllinie (169.4) i.p. injiziert, welche den monoklonalen CD8a spezifischen Antikörper produziert. Die Depletion erfolgte vier Mal im Abstand von zwei Tagen, wobei die letzte Injektion einen Tag vor Versuchsdurchführung erfolgte. Bei der Injektion befanden sich die Mäuse überspannt in Rückenlage. Das Bauchfell war dabei gespannt, wodurch bei der Injektion keine inneren Organe verletzt werden konnten.

3.1.3 Organentnahme

Für die Organentnahme wurden die Tiere zuvor durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden sie in Rückenlage an den Extremitäten aufgespannt und das Bauchfell mit einer stumpfen Schere geöffnet. Es wurden die zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten entnommen und bis zur weiteren Verwendung in einer 6-well Platte mit 5 ml PBBS auf Eis gelagert. Für die Entnahme der Milz wurde die

Peritonealhaut angehoben und an entsprechender Stelle geöffnet und die Milz mit einer stumpfen Pinzette entnommen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Milzen ebenfalls in einer 6-well Platte mit 10 ml PBBS auf Eis gelagert. Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden beide Hinterbeine der Maus verwendet. Ober- und Unterschenkelknochen wurden von Muskeln und Sehnen befreit und ebenfalls in PBS auf Eis gelagert.

3.1.4 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus Organen

Milz- bzw. Lymphknotenzellsuspensionen wurden hergestellt, indem diese Organe durch ein auf einem 50 ml Schraubverschlussröhrchen aufsitzendes Zellsieb gerieben wurden und dieses Sieb anschließend mit 5 ml (Lymphknoten) oder 10 ml (Milz) sterilem PBBS gespült wurde. Die Knochenmarkszellsuspensionen wurden hergestellt, indem das Knochenmark mit Hilfe einer 2 ml Einmalspritze und einer G23 Kanüle mit insgesamt 5 ml PBBS durch die eröffneten Epiphysen der entsprechenden Knochen herausgespült und die Zellsuspension in einem 15 ml Schraubverschlussröhrchen aufgefangen wurde. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde von allen Zellsuspensionen ein Aliquot entnommen und die Suspension anschließend mit 300 x g bei 10°C für 8 min zentrifugiert. Zum Einstellen der gewünschten Zellzahl wurden die Zellpellets mit RPMI-Medium verdünnt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte anhand einer Neubauer-Zählkammer. Durch die zusätzliche Verwendung von Trypanblau konnte zusätzlich eine Aussage über den Vitalitätszustand der Zellen getroffen werden. Da tote Zellen eine veränderte Membrandurchlässigkeit aufweisen, können Farbstoffe wie z.B. Trypanblau die Membran lebender Zellen nicht passieren und gelangen nur in tote Zellen. Beim Auszählen wurde darauf geachtet, keine Zellaggregate auszuzählen, da dies die Genauigkeit der Zählung beeinflusst.

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde eine geeignete Verdünnung der Zellen (1:10 bei Lymphknoten- und Knochenmarksuspensionen und 1:20 bei Milzsuspensionen) mit Trypanblau erstellt und mittels einer Neubauer-Zählkammer vier Großquadrate à 16 Kleinquadraten ausgezählt.

Jedes Quadrat hat eine Fläche von $0,04 \text{ mm}^2$ hat und eine Tiefe von 1 mm . Somit ergibt sich ein Volumen von $0,004 \text{ }\mu\text{l}$. Die ermittelte Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$C = N \times 10^4$$

C = Zellen pro ml

N = Mittelwert der gezählten Zellen

10^4 = Volumenrechnungsfaktor für 1 mm^3

Die Gesamtzellzahl wurde berechnet, indem die Zellen pro ml mit dem Volumen der zu bestimmenden Probe multipliziert wurden.

3.3 In vivo Herstellung einer Friend Virus Präparation

Der FV-Komplex besteht aus zwei Viren, dem Spleen Focus Forming Virus (SFFV) und dem Friend Murine Leukemia Virus (F-MuLV) (siehe Abschnitt 1.1.6). Für die Präparation des FV wurden Balb/c-Mäuse mit 3000 SFFU infiziert und nach neun Tagen getötet. Die Milzen wurden entnommen und ein Milzzellhomogenat (15%) in PBBS mit 2 mM EDTA erstellt. Der so erstellte Virusstock wurde bei -80°C gelagert. Um die Viruskonzentration dieses Stocks zu ermitteln, wurden Y10A Mäuse mit verschiedenen Verdünnungen des Milzzellhomogenats infiziert. Die Tiere wurden nach 14 Tagen getötet und die Milzen entnommen. Mit Hilfe der sogenannten Bouin's Lösung wurden maligne Zellhaufen (Foci), die durch die FV-Infektion entstanden, auf der Milzoberfläche angefärbt. Die Anzahl dieser ausgezählten Foci ergab die Viruskonzentration in SFFU für den aktuell hergestellten Stock.

3.4 Herstellung einer Friend Murine Leukemia Virus-Präparation in vitro

Mus dunni Zellen wurden in 25 cm^2 Zellkulturflaschen in 10 ml RPMI-Vollmedium ausgesät. Hierzu wurden $50 \text{ }\mu\text{l}$ Polybren ($0,8 \text{ }\mu\text{g/ml}$) zugegeben und die Zellen mit einem F-MuLV-Stock ($\text{MOI}=1$) infiziert. Anschließend wurden die Zellen für drei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Zellen im Folgenden zweimal im Verhältnis 1:4 gesplittet. Hierzu wurden sie mit Trypsin abgelöst, in RPMI Medium aufgenommen, verdünnt und erneut ausgesät. Bei jedem Splitten wurde der Überstand geerntet, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die weitere Verwendung mussten die Aliquots aufgereinigt werden. Hierzu wurde der

Überstand aufgetaut und bei 3000 RPMI für 15 Min zentrifugiert. Dann wurde der Überstand auf 7 ml 30% Succrose gegeben und für 3 Stunden und 4 °C bei 22000 RPMI zentrifugiert. Hiernach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50-200 µl sterilem PBS resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Virus bei -80 °C gelagert. Schließlich wurde die Aktivität des F-MuLV mittels des Infectious Center Assays bestimmt (siehe 3.6).

3.5 Zellkultur

3.5.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgte allgemein in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂/Luft-Gemisch. Adhärent wachsende Zelllinien wurden in liegenden Kulturflaschen inkubiert. Zum Ernten und Verdünnen dieser Zellen wurde das verbrauchte Medium dekantiert und um das restliche Medium zu entfernen für kurze Zeit mit PBS überschichtet. Nachdem das PBS entfernt wurde, wurden die Zellen mit 5% Trypsin-EDTA überschichtet und für 5 min im Brutschrank inkubiert. Der Prozess der Ablösung der Zellen wurde durch die Zugabe von 10 ml kaltem Vollmedium gestoppt und die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (300 x g; 5 min). Das so gewonnene Zellpellet wurde in Vollmedium gelöst und im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in neue Kulturflaschen ausgesät.

3.5.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Wenn Zellen für eine längere Zeit gelagert werden mussten, erfolgte dies in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen in Medium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen. DMSO diffundiert durch die Zellmembran in die Zelle und ersetzt dort das Wasser. Es erhält somit die Löslichkeit in der Zelle und sorgt dafür, dass beim Einfriervorgang keine Eiskristalle gebildet werden, welche die Zellstruktur zerstören würden. Zum Einfrieren wurden die Zellen auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, anschließend 5 min bei 300 x g zentrifugiert und das Zellpellet nochmal in PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in dem zuvor angesetzten 10% DMSO enthaltendem Medium resuspendiert und Aliquots eines entsprechenden Volumens für 2-3 h bei -20°C eingefroren, über Nacht bei -80°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Auftauen

Bevor eingefrorene Zellen wieder in Kultur genommen werden konnten, musste zunächst das DMSO aus dem Medium entfernt werden. Daher wurden die Zellen schnell im Wasserbad (37°C) aufgetaut und nach dem Auftauen in 10 ml warmem Medium aufgenommen und zentrifugiert (300 x g, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und um das DMSO gänzlich zu entfernen, wurde das Pellet erneut mit warmem Medium gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert, verschiedene Mengen der Zellsuspension in eine sterile Zellkulturflasche überführt und diese auf das entsprechende Volumen mit Medium aufgefüllt. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37°C.

3.6 Nachweis von infektiösen Zellen mittels Infectious Center Assay

Für die Bestimmung der Anzahl FV-infektiöser Zellen mittels des Infectious Center Assays, wurden Zellsuspension der zu untersuchenden Organe FV-infizierter Mäuse hergestellt. Aus den jeweiligen Zellsuspensionen wurde eine Verdünnungsreihe (10^7 - 10^2) erstellt und jede Verdünnungsstufe mit Mus dunni Zellen als Indikatorzellen koinkubiert. Infektiöse Zellen infizieren durch Zell-Zell-Kontakt die Mus dunni Zellen. Diese teilen sich und geben das Friend Virus an ihre Tochterzellen weiter. Hierdurch entstanden Foci, welche mittels Antikörper- und Substratreaktion angefärbt werden konnten. Als FV-spezifischer Antikörper wurde AK720 verwendet, welcher an das env-Protein von MuLV bindet. Der Zweitantikörper ist an die Meerrettichperoxidase gekoppelt (Ziege-Anti-Maus IgG2b-HRP) und bindet kovalent an die Fc-Region des ersten Antikörpers. Die Peroxidase setzt das lösliche Substrat AEC um und es entsteht ein unlösliches rotes Produkt. So werden Virus-Foci als rote Punkte auf dem Zellrasen sichtbar. Anhand der Verdünnungsreihe und der Gesamtzellzahl konnte die Anzahl der infektiösen Zellen in der Milz errechnet werden.

Für jede zu untersuchende Zellsuspension infektiöser Zellen wurde eine 6-well Gewebekulturplatte derart präpariert, dass pro Vertiefung 2×10^4 Mus dunni-Zellen in 3 ml Medium ausgesät wurden. Am nächsten Tag wurden die infektiösen Zellsuspensionen mit Medium auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Hiervon wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, von der jeweils 1×10^7 bis 1×10^2 Zellen auf die Indikatorzellen gegeben wurden. Die Indikatorzellen und die verdünnten infektiösen Zellen wurden drei Tage im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 5% CO₂ Atmosphäre co-inkubiert. Als Kontrolle des Tests wurden jeweils 3

Vertiefungen mit F-MuLV und 3 weitere ohne Virus, bzw. infektiöse Zellen mitgeführt. Bei der Kontrolle mit freiem Virus musste Polybren A (8 µg/ml) hinzugegeben werden, damit das freie Virus besser an die Rezeptoren der Zelloberfläche binden konnte.

Drei Tage später wurde das Medium entfernt und die Zellen zur Fixierung 5 min mit 95% Ethanol behandelt. Nach zweimaligem Waschen, einmal mit PBS und dann einmal mit PBS komplementiert mit 0,1% BSA wurden pro Vertiefung 700 µl Hybridomaüberstand des ersten Antikörpers (AK720) zugegeben und 120 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Platten zweimal mit PBS (+ 0,1% BSA) gewaschen. Der zweite Antikörper (Ziege anti Maus IgG2b-HRP; 0,05 mol/l) wurde 1:500 in PBS (+ 0,1% BSA) verdünnt und davon jeweils 700 µl pro Vertiefung auf die Zellen gegeben und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Dekantieren und zweimaligem Waschen mit PBS wurden jeweils 1 ml frisch angesetzte Substratlösung AEC zugegeben und 20 min im Dunkeln inkubiert. Hierauf folgten zwei weitere Waschschrte mit H₂O und das Trocknen der Platten über Nacht. Wenn die Platten getrocknet waren, konnten die Foci ausgezählt werden. Anschließend wurde der Mittelwert der Anzahl an Foci in der 10⁶ Verdünnung ermittelt und so der Wert infektiöser Zellen pro Million Zellen des jeweiligen Organs bestimmt.

3.7 Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation zu analysieren. Hierbei können spezielle Oberflächenproteine und intrazelluläre Proteine der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden.

Grundsätzlich beruht die Durchflusszytometrie auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die eingesetzten monoklonalen Antikörper sind an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und gegen bestimmte Oberflächenmoleküle der Zellen gerichtet. Die Zellen einer Suspension werden durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet und so einzeln erfasst. Beim Auftreffen des Laserstrahls auf die Zelle wird dieser abgelenkt. Diese Ablenkung wird in zwei Kategorien unterteilt. Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) detektiert die relative Größe der einzelnen Zellen. Das Licht, das von den Zellen um 90° abgelenkt wird, ermöglicht Aussagen über die innere Granularität der

Zellen und wird Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) genannt. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Hierbei verhält sich die emittierte und durch einen Photonendetektor registrierte Photonenkonzentration proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Die Lichtsignale werden proportional zur Lichtstärke in elektronische Signale umgewandelt (Abbildung 3.1). Die gleichzeitige durchflusszytometrische (Fluorescence activated cell sorting, FACS) Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

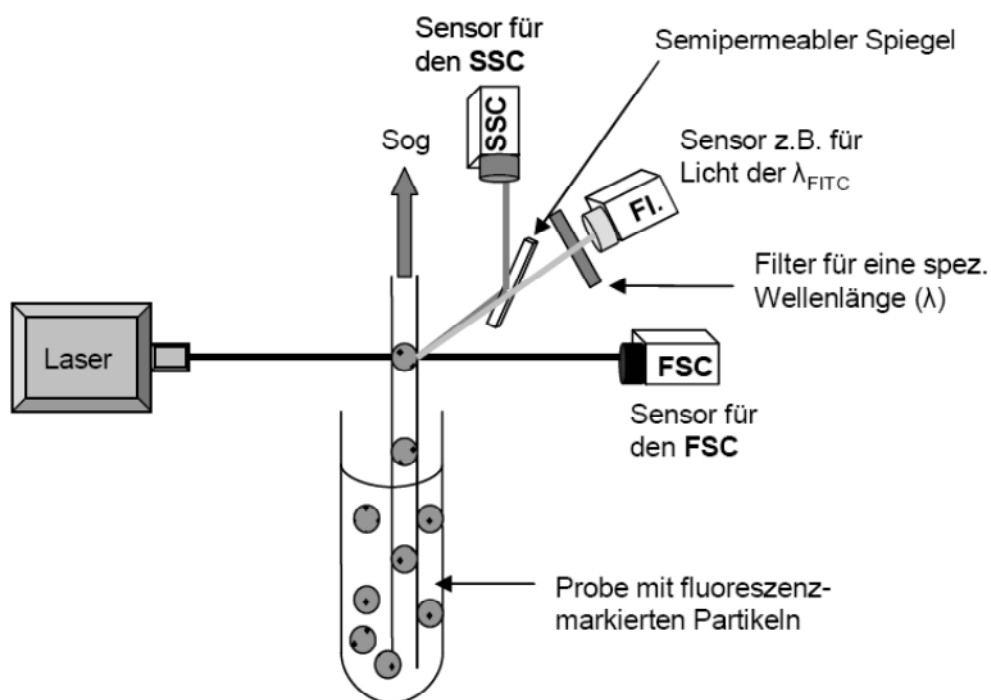


Abbildung 3.1 Funktionsweise eines Durchflusszytometers (verändert nach (83))

Für jede FACS-Färbung wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Natriumazid, welches in diesem Puffer enthalten ist, wirkt antibakteriell. EDTA verringert die Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand und BSA das Ausmaß an unspezifischen Antikörperbindungen. Die Auswertung, z.B. mit dem FACS Diva

Analyse Programm, wird meist anhand eines Punktgraphen (Dot-Plot) vorgenommen, in dem jede Zelle als einzelner Punkt dargestellt wird. Die Position des Punktes im Graphen lässt Rückschlüsse auf die Zelleigenschaften zu. So können anhand der Größe und Granularität die Zellen im Punktgraphen aufgetrennt und unterschieden werden.

3.7.1 Ausschluss toter Zellen in der Durchflusszytometrie

Um tote Zellen und Zelltrümmer bei der Durchflusszytometrie auszuschließen, wurde bei nicht fixierten Oberflächenfärbungen kurz vor der Messung der Farbstoff Propidiumiodid im Verhältnis 1:200 zu den Zellen gegeben. Dies ist ein fluoreszierender DNA Farbstoff, der in die DNA interkaliert und mit dieser einen Komplex bildet. Dieser Farbstoff kann nur in apoptotische Zellen eindringen, da bei gesunden Zellen die intakte Zellmembran das Eindringen des Farbstoffs verhindert. Apoptotische Zellen, verfügen hingegen nicht mehr über eine intakte Zellmembran und der Farbstoff dringt schnell in die Zelle ein. Dort gelangt er schließlich in den Zellkern und an die DNA, in welche er interkaliert. Da sich PI nicht fixieren lässt, wurde bei den intrazellulären Färbungen mit fixable viable dye (FVD) gearbeitet. In beiden Fällen werden entsprechend gefärbte Zellen zytometrisch (LSRII) erfasst und von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

3.7.2 Färbung von Oberflächenproteinen

Für die Oberflächenfärbungen wurden 1×10^6 Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, für 5 min mit 300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer und 0,5 µl konjugiertem Antikörper gegen verschiedene Oberflächenmoleküle, z.B. CD8, CD4, CD43, etc. aufgenommen und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und anschließend in einem Volumen von 300 µl zur Messung resuspendiert.

3.7.3 Intrazelluläre Färbungen von Granzym B

Für den Nachweis von intrazellulärem GzmB wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung einmal in FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und dann nach dem Protokoll des Herstellers des Cytofix/Cytoperm-Kits fixiert und permeabilisiert. Die Permeabilisierung ermöglicht es den Antikörpern, welche gegen intrazelluläre Proteine gerichtet sind, in die Zelle einzudringen und ihre Zielstrukturen

zu binden. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden PermWash-Puffer wurden die Zellen mit 100 μ l PermWash-Puffer mit 0,5 μ l GzmB-Antikörper für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PermWash-Puffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min), in einem Volumen von 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

3.7.4 Intrazelluläre Färbung von IFN- γ , TNF- α , IL-2 und IL-4

Um die Produktion von Zytokinen wie z.B. IFN- γ , TNF- α IL-2 und IL-4 in den Zellen zu untersuchen, müssen diese zunächst zur Zytokinproduktion angeregt und die Sekretion der produzierten Zytokine verhindert werden, so dass die Zytokine in der Zelle akkumulieren. Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 5 h mit 10 μ g/ml immobilisiertem α CD3, 2 μ g/ml α CD28 und 2 μ g/ml Brefeldin A (BFA) in RPMI-Medium (komplementiert mit 50 μ M β -Mercaptoethanol) bei 37°C inkubiert. Durch die Antikörper kommt es zu einer unspezifischen Stimulation des T-Zellrezeptors und der damit verbundenen Zytokinsynthese. Das BFA blockiert den vesikulären Proteintransport vom rauen endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und führt so zu einer Akkumulation von Zytokinen in der Zelle. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenmoleküle wurden wie bereits in 3.7.2 beschrieben gefärbt. Danach erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und die Färbung intrazellulärer Proteine wie in Abschnitt 3.7.3 beschrieben. Die Zellen wurden nach der Färbung in einem Volumen von 300 μ l mit FACS-Puffer aufgenommen und mit Hilfe eines LSR II Durchflusszytometers analysiert.

3.7.5 Intrazelluläre Färbung von Foxp3

Der Nachweis von intrazellulärem Foxp3 erfolgte nach der Oberflächenfärbung. Hierzu wurden die Zellen einmal in FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers des Foxp3-Staining Sets fixiert und permeabilisiert. Nach einmaligem Waschen mit dem entsprechenden PermWash-Puffer wurden die Zellen mit 100 μ l PermWash-Puffer mit 0,5 μ l Foxp3-Antikörper für etwa 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PermWash-Puffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min), in einem Volumen von 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.7.6 Cell Trace Violet Färbung

Um Zellen, die von einer Donormaus in weitere Mäuse transferiert werden sollten, zu markieren und so später von den Zellen der Empfängermäuse unterscheiden zu können, wurden die zu transferierenden Zellen mit Cell Trace Violet gefärbt. Hierbei handelt es sich um einen violett fluoreszenzierenden Farbstoff, der unspezifisch in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eingebaut wird. Dies ermöglicht die durchflusszytometrische Detektion der transferierten Donorzellen innerhalb der Zellpopulationen der Empfängermäuse ohne weitere Anfärbung mit Antikörpern. Die aus den naiven Donormäusen isolierten Lymphozyten wurden hierfür nach den Angaben des Herstellerprotokolls gefärbt und anschließend in die Empfängermäuse transferiert. 2 Stunden später wurden diese getötet und die Zellsuspensionen der zu untersuchenden Organe umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

3.7.7 Tetramerfärbung

Antigen-spezifische T-Zellen können innerhalb einer T-Zellpopulation mittels der Tetramer-Technologie identifiziert und quantifiziert werden. MHC Klasse II-Tetramere bestehen aus vier Peptid-MHC Klasse II-Komplexen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verknüpft sind. Der Komplex wird über einen konjugierten Fluor Farbstoff im Durchflusszytometer visualisiert. Bei dieser Methode macht man sich die Wechselwirkungen des Antigen-spezifischen T-Zellrezeptors mit den Peptid-bindenden MHC-II-Komplexen zu Nutze. Der Aufbau eines Tetramers ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

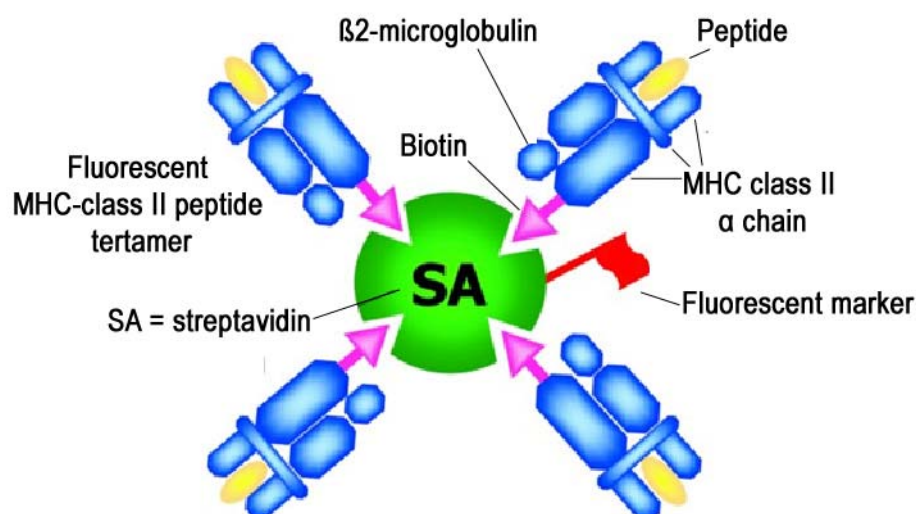


Abbildung 3.2 Aufbau eines MHC Klasse II-Tetramers (verändert nach (29))

Für die Tetramerfärbung wurden 5×10^5 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden zweimal in FACS-Puffer gewaschen (300 x g; 5 min) und die Tetramere wurden im Verhältnis 1:100 in einem Volumen von 50 μ l für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Hiernach wurden die Zellen zweimal mit FACS Puffer gewaschen, in 300 μ l FACS-Puffer mit Propidiumiodid aufgenommen und umgehend im Durchflusszytometer gemessen.

3.8 Depletion von CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen mittels zell-spezifischer Antikörper

Zur Depletion von Lymphozyten in Mäusen wurden Zell-spezifische monoklonale Antikörper mittels Hybridomazelllinien hergestellt. Diese wurden bei der Kultivierung in den Überstand abgegeben. Zur Depletion von CD8⁺ T-Zellen wurde der Überstand der Hybridomazelllinie 169.4 und zur Depletion von CD4⁺ T-Zellen der Überstand der Hybridomazelllinie 191.1 verwendet. Der Antikörper gegen CD4 wurde 1/3 in sterilem PBS verdünnt, der Antikörper gegen CD8 wurde unverdünnt eingesetzt. Für die Depletion in der akuten Phase der FV-Infektion wurden pro Injektion 500 μ l Zellkulturüberstand i.p. mit einer G25-Kanüle inokuliert, beginnend zwei Tage nach der Infektion. Es folgten drei weitere Injektionen im Abstand von 2 Tagen. Zehn Tage nach der FV Infektion wurden die Tiere getötet und die Depletion der CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer mit einem T-Zell-spezifischen Marker überprüft.

Für die Depletion der CD8⁺ T-Zellen in der chronischen Phase der FV-Infektion erfolgten vier Injektionen des Zell-spezifischen Antikörpers, abschließend mit Tag 59 nach Infektion. Die Tiere wurden am Tag nach der letzten Injektion getötet und die Depletion ebenfalls durchflusszytometrisch überprüft. Eine Depletionseffizienz von 90%, wie in Abbildung 4.10 gezeigt, war reproduzierbar.

3.9 Depletion von CD4⁺Foxp3⁺GFP⁺ regulatorischen T-Zellen in DEREG Mäusen

Das Diphtherietoxinrezeptor-GFP-Fusionsprotein wird unter der Kontrolle des Foxp3 Promoters expremiert. Somit ist es möglich, die regulatorischen T-Zellen in diesen Mäusen selektiv zu depletieren. Die Bindung des injizierten DT an den Rezeptor, der ausschließlich von Foxp3⁺ Zellen expremiert wird, induziert in diesen Zellen die Apoptose (57). Dabei wird kein Einfluss auf andere Zelltypen genommen. Durch die Expression des an den Diphtherietoxinrezeptor gekoppelten GFPs lässt sich die

Depletion der Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen im Durchflusszytometer überprüfen. Für die Depletion dieser Zellen in der akuten FV-Infektion wurden den entsprechenden Tieren an Tag 3, 6, 9, nach Infektion 0,5 µg DT pro Maus in 500 µl sterilem PBS i.p. injiziert. Die Depletion in der chronischen Phase der FV-Infektion erfolgte an Tag 53, 56 und 59 nach Infektion mit derselben Menge DT. Die Depletionseffizienz wurde einen Tag nach der letzten Depletion untersucht. Die Tiere wurden getötet und die zu untersuchenden Organe entnommen. Die entsprechenden Zellsuspensionen wurden im Durchflusszytometer auf das Vorhandensein von GFP⁺ Zellen hin untersucht. Eine Depletionseffizienz von 97%, wie in Abbildung 4.9 gezeigt, war reproduzierbar.

3.10 Stimulation mittels α-CD137 Antikörper

Zur Induktion der zytotoxischen Immunantwort wurde den Mäusen jeden zweiten Tag, beginnend an Tag 4 nach FV-Infektion 100µg α-CD137 Antikörper gelöst in einem Gesamtvolumen von 500 µl i.p. injiziert.

3.11 In vivo CTL-Test

Der in vivo CTL-Test ermöglicht eine Untersuchung der spezifischen Zytotoxizität von T-Zellen in der Maus. Um eine Aussage über die Funktionalität der CD4⁺ T-Zellen treffen zu können, wurden aus naiven Mäusen isolierte Lymphozyten artifiziell mit einem MHC-II FV Peptid beladen. Die spezifische Eliminierung dieser Zielzellen durch zytotoxische CD4⁺ T-Zellen, gibt im Folgenden Aufschluss über die zytotoxische Funktionalität von CD4⁺ T-Zellen. Zu diesem Zweck wurden von naiven C57BL/6 Mäusen Lymphozyten aus Knochenmark und Lymphknoten isoliert. Nach dem Waschschrift wurden die Lymphozyten aus Knochenmark und Lymphknoten vereinigt und auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Die Zellsuspension im ersten Röhrchen wurde mit 1 µM MHC-II spezifischem F-MuLV-Peptid beladen, im zweiten Röhrchen wurden die Zellen nicht mit einem Peptid beladen. Beide Röhrchen wurden für 1,5 h bei 37°C im Schüttler geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen in beiden Röhrchen mit je einem der beiden Farbstoffe Violet cell trace (mit Peptid) und 40 nM CFSE (ohne Peptid) gefärbt. Abgesehen vom verschiedenen Farbstoff sind die Färbeprotokolle für Cell Trace Violet und CFSE identisch. Durch die verschiedenen Farbstoffe können beide Zellpopulationen später im Durchflusszytometer voneinander und auch von den Empfängerzellen unterschieden werden. Nach der

Inkubation für 10 min bei 37°C wurden die Röhrchen für 5 min auf Eis gelagert und dann einmal gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen beider Populationen gezählt und im Verhältnis 1:1 zusammengeführt. Im Anschluss daran wurden insgesamt 4×10^7 Zellen in unbehandelte, FV-infizierte und DT-behandelte, FV-infizierte und antiCD8-behandelte und FV-infizierte und antiCD8- + DT behandelte Mäuse i.v. injiziert (dies entspricht 2×10^7 Zellen jeder Population). Als Kontrollen wurden zusätzlich naive Mäuse als Rezipienten mitgeführt. Die so behandelten Mäuse wurden 2 h nach dem Transfer der Zellen durch zervikale Dislokation getötet. Nach Entnahme der Milz wurden die Einzelzellsuspensionen auf die injizierten Zellpopulationen hin untersucht. Im Durchflusszytometer wurde die Zellzahl beider injizierter Populationen (Peptid-beladene Zellen und unbeladene Kontrollen) gemessen und das spezifische Töten von Zielzellen durch $CD4^+$ T-Zellen wie folgt bestimmt:

$$\% \text{ Eliminierung} = 100 - \frac{\% \text{ peptidbeladene Lymphozyten in infizierten Mäusen}}{\% \text{ peptidbeladene Lymphozyten in naiven Mäusen}} \times 100$$

3.12 Bestimmung der Proliferation von bestimmten Zellpopulationen mit Hilfe von α -Ki67

Zur Bestimmung der Proliferation wurde ein α -Ki67 Antikörper eingesetzt. Ki67 lässt sich während der gesamten Interphase des Zellzyklus im Zellkern detektieren, nicht aber in der G0-Phase des Zellzyklus. Daher eignet es sich, um alle zum Zeitpunkt der Analyse proliferierenden Zellen zu detektieren. α -Ki67 muss in permeabilisierten Zellen angewendet werden und wurde in dieser Arbeit in Kombination mit der Foxp3 Färbung in einem Volumen von 50 μ l und einem Verhältnis von 1:10 eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Kinetik der Proliferation FV-induzierter $CD4^+$ Effektor T-Zellen

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob die FV-Infektion auch zu einer Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen führt, da dies bereits für $CD8^+$ T-Zellen beobachtet worden war. Zu diesem Zweck wurde der α -Ki67 Antikörper verwendet. Dieser bindet das Ki67 Protein, welches ausschließlich auf Zellen zu finden ist, die sich in der mitotischen Phase des Zellzyklus befinden. Daher werden hiermit ausschließlich Zellen detektiert, die zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung proliferierten. In diesem Versuch wurden ausschließlich $Foxp3^- CD4^+$ T-Zellen analysiert, da Tregs gesondert untersucht werden sollten. Es zeigte sich, dass bei den naiven Tieren ca. 8,5% der $Foxp3^- CD4^+$ T-Zellen proliferierten. Dieser Anteil vergrößerte sich signifikant an Tag 8 (ca. 20%) und Tag 10 (ca. 18,5%) nach FV-Infektion. Die chronisch infizierten Tiere hatten hingegen sehr wenig im Zellzyklus befindliche $Foxp3^- CD4^+$ T-Zellen (ca. 5%) (Abbildung 4.1). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von $Foxp3^- CD4^+$ T-Zellen durch die FV-Infektion induziert wird.

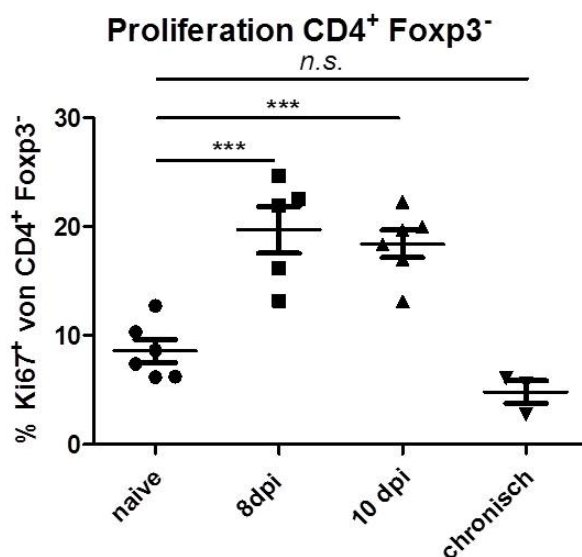


Abbildung 4.1 Kinetik der Proliferation der $Foxp3^- CD4^+$ T-Zellen in der Milz.

FV-infizierte Tiere wurden zu den Zeitpunkten 8, 10 und 60 Tage nach Infektion getötet und Milzzellsuspensionen dieser und naiver Tiere, wurden auf die Expression des Oberflächenmoleküls CD4 und des intrazellulären Proteins Ki67 durchflusszytometrisch untersucht. Die Grafik zeigt den prozentuellen Anteil der Ki67 positiven Zellen an der Gesamtpopulation $CD4^+$ $Foxp3^-$ Lymphozyten in der Milz. Jeder Punkt symbolisiert eine einzelne Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.2 Expansion FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion

Um die FV-induzierte CD4⁺ T-Zellpopulation phänotypisch und funktionell zu untersuchen, ist es unerlässlich, diese möglichst genau zu definieren. Mittels der Tetramer Technologie (siehe Abschnitt 3.7.7) ist es möglich, durchflusszytometrisch CD4⁺ T-Zellen zu detektieren, deren TCR spezifisch für ein bekanntes FV-Epitop ist. Um zu ermitteln in welchem Maße FV-spezifische (Tet II⁺) CD4⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion expandieren, wurden Zellsuspensionen aus Milz- und Knochenmark naiver und 10 Tage FV-infizierter Tiere mittels dieser Technologie untersucht (Abbildung 4.2). Es zeigte sich, dass die Anzahl FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen, im Vergleich zu Milzzellen aus naiven Mäusen, signifikant erhöht war. Durchschnittlich 1% aller CD4⁺ T-Zellen der akut infizierten Mäuse war FV-spezifisch (Abbildung 4.2A). Im Knochenmark war der prozentuelle Anteil noch höher. Hier waren ca. 2% aller CD4⁺ T-Zellen FV-spezifisch (Abbildung 4.2B).

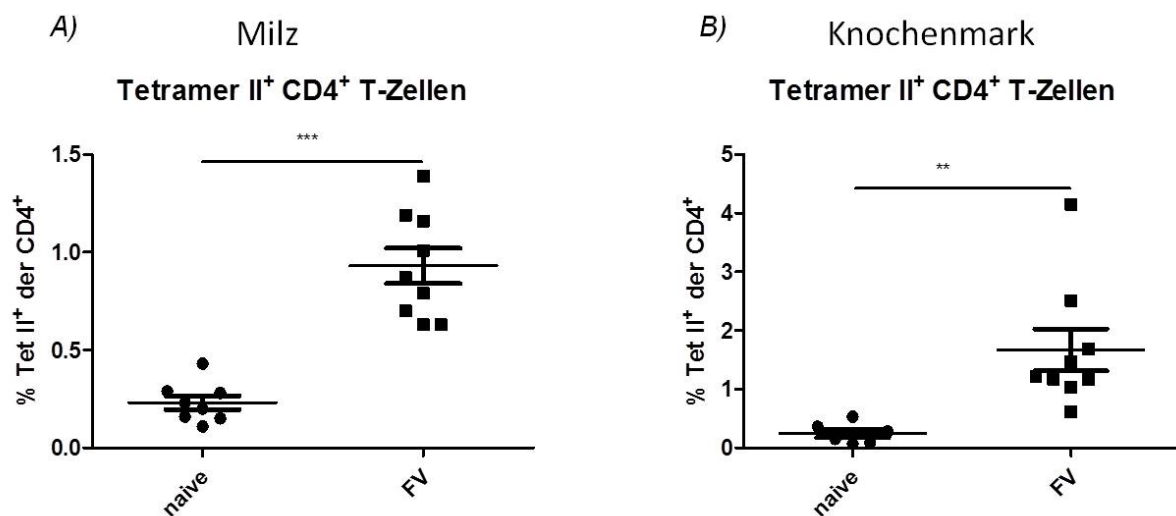


Abbildung 4.2 Expansion FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in Milz und Knochenmark 10 Tage nach FV-Infektion.

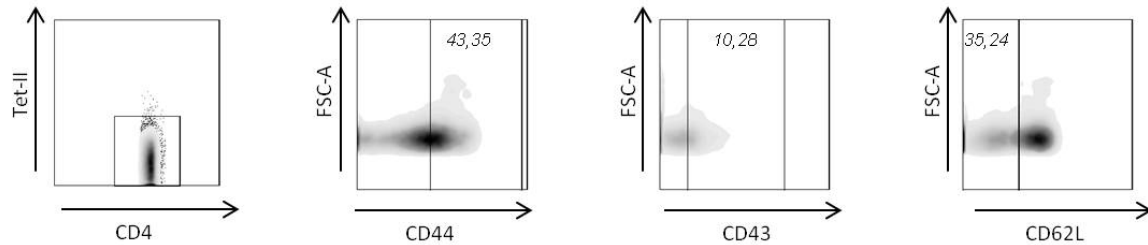
Mit FV-infizierte Mäuse wurden nach 10 Tagen getötet und die Zellsuspensionen von Milz (A)- und Knochenmark (B) mittels CD4 Antikörper und MHC-II Tetramere gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.3 Definition FV-induzierter Effektor CD4⁺ T-Zellen

Die nachfolgende funktionelle Analyse der FV-induzierten CD4⁺ T-Zellen beinhaltete auch die Detektion intrazellulärer Moleküle, wie IFN- γ oder GzmB. Dies machte Fixierungs- und Permeabilisierungsvorgänge nötig, welche nicht mit einer Tet-II Färbung kombinierbar sind, da die Bindung der MHC-II Tetramere an die entsprechenden TCRs der CD4⁺ T-Zellen sehr schwach ist. Aus diesem Grund wurde die FV-spezifische Zellpopulation mittels verschiedener Oberflächenmoleküle als Effektorzellpopulation definiert. Zu diesem Zweck wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD44, CD43 und CD62L auf der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation der Milzsuspension einer naiven Maus mit der Expression dieser Moleküle auf CD4⁺ Tet II⁺ T-Zellen der Milzsuspension einer 10 Tage infizierten Maus verglichen (Abbildung 4.3). Dies erlaubt den phänotypischen Vergleich von FV-spezifischen und unspezifischen CD4⁺ T-Zellen. Der Vergleich repräsentativer Dot Plots erlaubt erste Aussagen über die Eignung der jeweiligen Marker (Abbildung 4.3A: naive Tiere, Abbildung 4.3B: akut infizierte Tiere). Für das Adhäsionsmolekül CD44 zeigte sich in repräsentativen Dot-Plots, dass im naiven Tier für 43,35% aller CD4⁺ T-Zellen ein positives Signal detektiert werden konnte. Obwohl im infizierten Tier 77,38% aller FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen positiv für CD44 waren, war die Hintergrundexpression im naiven Tier so hoch, dass der Unterschied zwischen naivem und infiziertem Tier zu gering war, um CD44 zur Definition einer FV-induzierten CD4⁺ Effektor T-Zellpopulation verwenden zu können. Im Vergleich dazu zeigten nur 10,28% aller CD4⁺ T-Zellen, die aus einer naiven Maus isoliert wurden ein positives Signal für das Membran-Sialoglykoprotein CD43 und 76,59% der FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, einer infizierten Maus. L-Selektin (CD62L) gilt als Oberflächenmolekül naiver Zellen, welches nach Aktivierung verloren geht. Aus diesem Grund wurde hierbei die im Durchflusszytometer als negativ definierte Population als aktiviert gewertet. Es wurden im Folgenden 35,34% aller CD4⁺ T-Zellen eines naiven Tiers und 75,79% aller FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen einer infizierten Maus als negativ gewertet. Bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Tiere ergab sich, dass durchschnittlich 37,3 % aller CD4⁺ T-Zellen der naiven Maus CD44 exprimieren. Im Vergleich zur Population der Tet II positiven CD4⁺ T-Zellen, (ca. 65%) war die CD44 Hintergrundexpression also sehr hoch (Abbildung 4.3C). Für den Marker CD43 ergab sich, dass er von ca. 2,5% aller CD4⁺ T-Zellen der naiven Mäuse exprimiert wurde und von durchschnittlich 65% der CD4⁺ Tet II⁺ T-Zellen

(Abbildung 4.3D). 21% der $CD4^+$ T-Zellen der naiven Maus zeigten ein niedriges Expressionslevel für CD62L. Im Gegensatz dazu hatten ca. 65% der FV-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen der infizierten Tiere dieses Molekül herunter reguliert (Abbildung 4.3E).

A) naive



B) FV infiziert

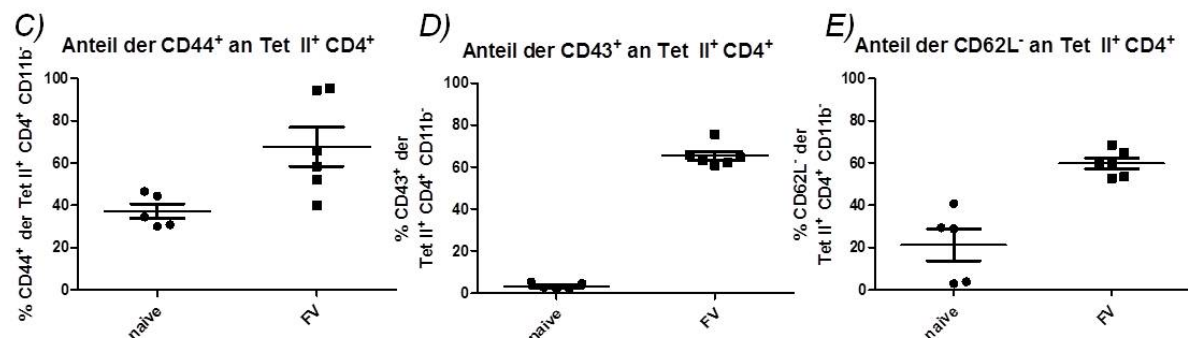
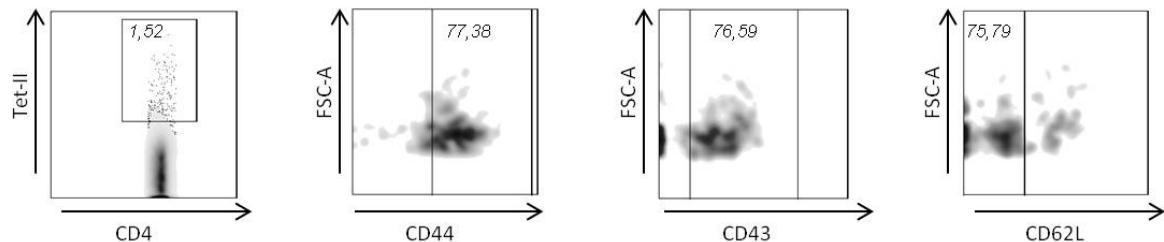


Abbildung 4.3 Vergleichende Expressionsanalyse

Vergleich der Expression der Oberflächenmoleküle CD44, CD43 und CD62L in der Milz auf $CD4^+$ T-Zellen einer naiven Maus und den $CD4^+$ Tet II^+ T-Zellen einer akut infizierten Maus. A) Repräsentative Dot-Plots der Expression der genannten Moleküle bei naiven Tieren, B) bei akut infizierten Tieren. (C-E) Graphisch Darstellung des prozentuellen Anteils an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation der naiven Kontrollgruppe oder der Tet II^+ T-Zellpopulation der akut infizierten Tiere, die C) CD44, D) CD43 oder E) CD44 expremieren.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde der Phänotyp $CD43^+$ $CD62L^-$ gewählt, um FV-induzierte Effektor $CD4^+$ T-Zellen zu untersuchen. In der Anwendung zeigte sich, dass die überwiegende Mehrheit der FV-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen die gewählte

Markerkombination expremierten. Der repräsentative FACS Dot-Plot der Milzzellen einer akut infizierten Maus zeigt, dass 63,53% der Zellen diesen Phänotyp zeigen (Abbildung 4.4A). Im Vergleich zu naiven Mäusen zeigte sich, dass durchschnittlich nur 1,8% der $CD4^+$ T-Zellen der naiven Mäuse den Phänotyp $CD43^+ CD62L^-$, aber 59,38% der $Tet II^+$ T-Zellen der akut infizierten Tiere (Abbildung 4.4B).

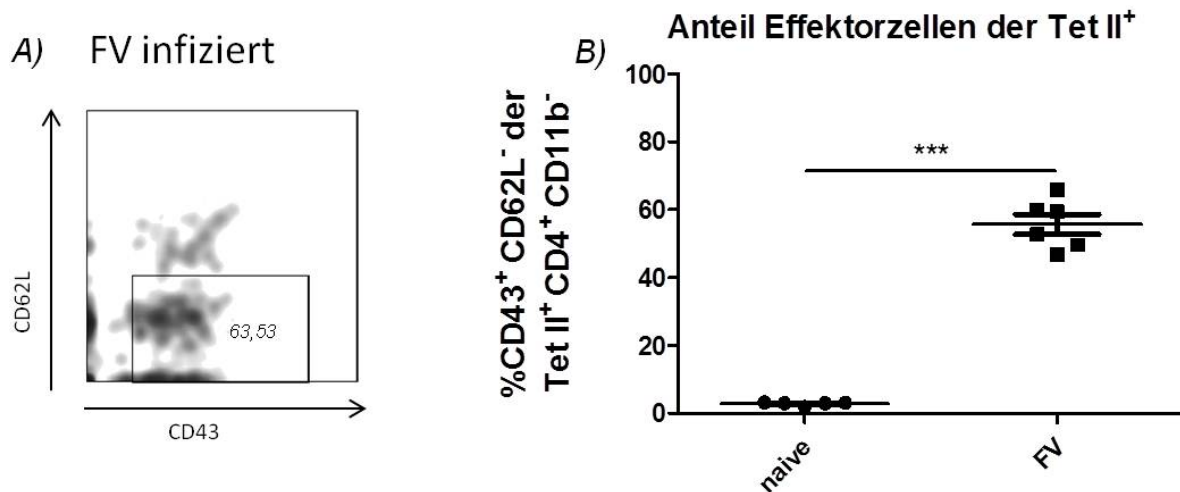


Abbildung 4.4 Anwendung der Markerkombination

A) repräsentativer Dot-Plot des Phänotyps $CD43^+ CD62L^-$ auf $CD4^+ CD11b^- Tet II^+$ T-Zellen der Milzzellen einer akut infizierten Maus. B) Graphisch aufbereitete Darstellung des prozentuellen Anteils der Effektorzellen ($CD43^+ CD62L^-$) an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation der naiven Kontrollgruppe oder der $Tet II^+$ T-Zellpopulation der akut infizierten Tiere. Jeder Punkt symbolisiert eine einzelne Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.4 Kinetik der Aktivierung FV-induzierter $CD4^+$ Effektorzellen

Da die nachfolgende funktionelle Analyse, FV-induzierter Effektor $CD4^+$ T-Zellen, am besten zum Zeitpunkt der maximalen Expansion aktivierter $CD4^+$ T-Zellen durchgeführt wird, wurde eine Kinetik der Aktivierung erstellt (Abbildung 4.5). Hierzu wurde zu den Zeitpunkten 7, 10, 14 und 21 Tage nach FV-Infektion der prozentuelle Anteil aktivierter Effektor $CD4^+$ T-Zellen ($CD43^+ CD62L^-$) an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation durchflusszytometrisch bestimmt. 10 Tage nach Infektion zeigte sich eine, im Vergleich zur Gruppe der naiven Tiere, signifikante Expansion der aktivierten $CD4^+$ T-Zellen. Beide nachfolgenden Zeitpunkte zeichneten sich durch eine leichte Abnahme der FV-induzierten $CD4^+$ Effektorzellen aus. Allerdings war der

prozentuelle Anteil an aktivierten $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zur Gruppe der naiven Tiere weiter signifikant erhöht. Der Höhepunkt der Expansion aktivierter $CD4^+$ T-Zellen an Tag 10 nach FV-Infektion, legt den Schluss nahe, dass dieser Zeitpunkt der Beste sei, um die Population der Effektor $CD4^+$ T-Zellen funktionell zu untersuchen.

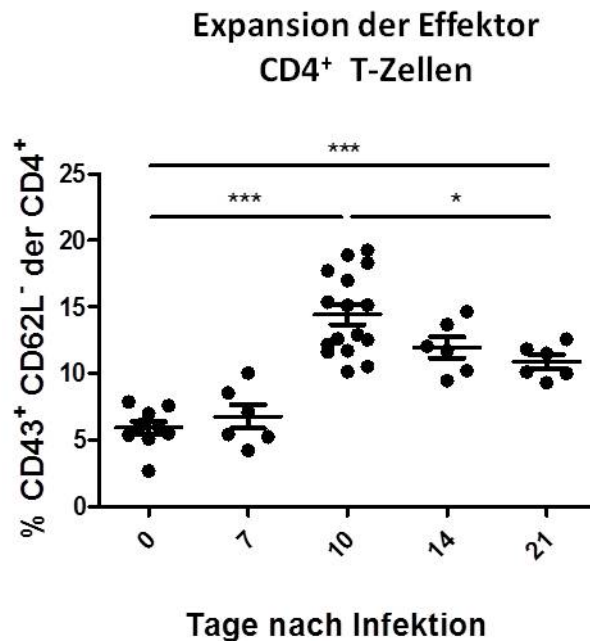


Abbildung 4.5 Kinetik der Expansion aktivierter $CD4^+$ T-Zellen in der Milz.

Mit FV-infizierte Tiere wurden zu den Zeitpunkten 7, 10, 14 und 21 Tage nach Infektion getötet und Milzzellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere, wurden auf die Expression der Oberflächenmoleküle $CD4$, $CD43$ und $CD62L$ durchflusszytometrisch untersucht. Die Grafik zeigt den prozentuellen Anteil der Effektorzellen ($CD43^+ CD62L^-$) an der Gesamtpopulation der $CD4^+$ T-Zellen. Jeder Punkt symbolisiert eine einzelne Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.5 Funktionelle Analyse von Effektor $CD4^+$ T-Zellen in der akuten FV-Infektion

4.5.1 Analyse der Expression von Effektorzytokinen

Es ist bekannt, dass die verschiedenen $CD4$ Subpopulationen verschiedene so genannte „Signaturzytokine“ exprimieren, anhand derer sie einzelnen $CD4$ Subtypen zugeordnet werden können (siehe hierzu 1.2.3.4.1). In dieser Arbeit wurde die Expression der Zytokine $IFN-\gamma$, $IL-2$ und $IL-4$ durch Effektor $CD4^+$ T-Zellen in der

akuten FV-Infektion durchflusszytometrisch untersucht und als prozentueller Anteil der Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation angegeben (Abbildung 4.7). Hierzu wurden Milzzellen naiver und 10 Tage FV-infizierter Mäuse durchflusszytometrisch verglichen. Aus repräsentativen FACS Dot-Plots der IFN- γ Expression in Effektor CD4⁺ T-Zellen der Milzen naiver und akut infizierter Tiere geht hervor, dass 1,4% der Effektor CD4⁺ T-Zellen eines naiven Tiers und 4,2% der Effektor CD4⁺ T-Zellen eines akut infizierten Tiers IFN- γ exprimieren. Durchschnittlich konnte eine signifikante Zunahme von 1,5% in der naiven Gruppe auf 3,8% in der Gruppe der infizierten Tiere beobachtet werden (Abbildung 4.6A). Die repräsentativen FACS Dot-Plots der IL-2 Expression zeigen, dass etwa 1,4% der Effektor CD4⁺ T-Zellen des naiven Tiers und 3,8% der Effektor CD4⁺ T-Zellen des akut infizierten Tiers IL-2 exprimierten. Im Vergleich zur Kontrollgruppe der naiven Tiere (1,3%) zeigte sich für IL-2 durchschnittlich eine signifikante Zunahme auf 3,5% (Abbildung 4.6B). Das letzte untersuchte Zytokin IL-4 zeigte keine signifikant gesteigerte Expression in FV-induzierten Effektor CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 4.6C). Abgesehen von IL-4 führte also die Infektion mit dem FV in den Effektor CD4⁺ T-Zellen der Milz zu einer Steigerung der Expression von IFN- γ und IL-2.

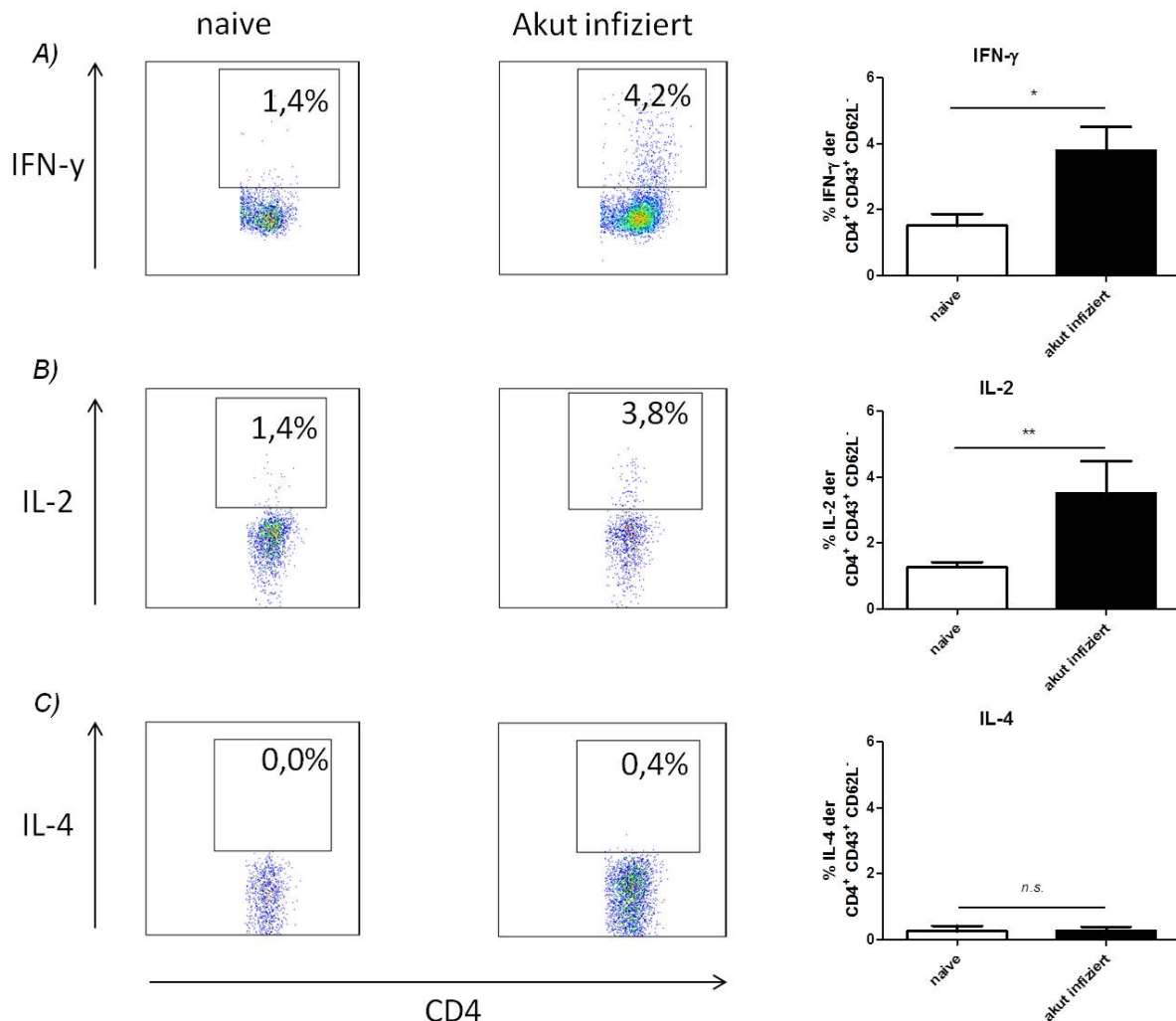


Abbildung 4.6 Expression von Effektorzytokinen durch FV-induzierte Effektor CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen aus naiven Tieren.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 10 Tage nach FV-Infektion getötet und Milzzellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere analysiert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Expression der intrazellulären Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-4 durch Effektor CD4⁺ T-Zellen untersucht. Die linke Bildhälfte zeigt repräsentative Dot-Plots inkl. der prozentuellen Angabe und die rechte Bildhälfte den prozentuellen Anteil an Zytokin expremierenden Effektor CD4⁺ T-Zellen. A) Daten der IFN- γ Analyse, B) Daten der IL-2 Analyse, C) Daten der IL-4 Analyse. Jeder Punkt symbolisiert eine einzelne Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.5.2 Analyse der Zytotoxizität der Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation

Um zu untersuchen ob Effektor CD4⁺ T-Zellen zytotoxische Moleküle produzieren, wurde die Expression von Granzym B (GzmB) analysiert. Hierzu wurden wieder Milzzellen naiver und 10 Tage infizierter Mäuse verglichen. Effektor CD4⁺ T-Zellen aus naiven Mäusen expremierten GzmB im Mittel zu 1,3%. Im Vergleich dazu kam

es bei den Effektor $CD4^+$ T-Zellen aus akut infizierten Mäusen zu einer signifikanten Erhöhung um 2,7% auf durchschnittlich 4% (Abbildung 4.7A). Das zytotoxische Potential von Effektor $CD4^+$ T-Zellen *in vivo* lässt sich auch mit Hilfe des MHC-II restringierten „in Vivo Kill Assays“ ermitteln (siehe Abschnitt 3.11). Für diesen Test wurden Lymphozyten von naiven Mäusen, welche mit einem FV-spezifischen MHC-II $CD4$ T-Zellepitop beladen wurden, als Zielzellen in 10 Tage FV-infizierte Mäuse injiziert. FV-spezifische Effektor $CD4^+$ T-Zellen erkennen dieses Peptid und eliminieren daraufhin die Zielzellen, wenn sie zytotoxisches Potential besitzen. Zwei Stunden nach Injektion der mit Cell trace Violet markierten Zellen wurden Milz und Knochenmark von naiven und 10 Tage infizierten Mäusen auf die FV-spezifische Eliminierung der Zielzellen hin untersucht. Es zeigte sich, dass akut infizierte Tiere im Durchschnitt nur ca. 5% der Zielzellen abtöteten. Da Werte unter 10% in diesem Test nicht als spezifische zytotoxische Aktivität angesehen werden, konnten also keine $CD4^+$ zytotoxischen T-Zellen nach einer FV-Infektion nachgewiesen werden.

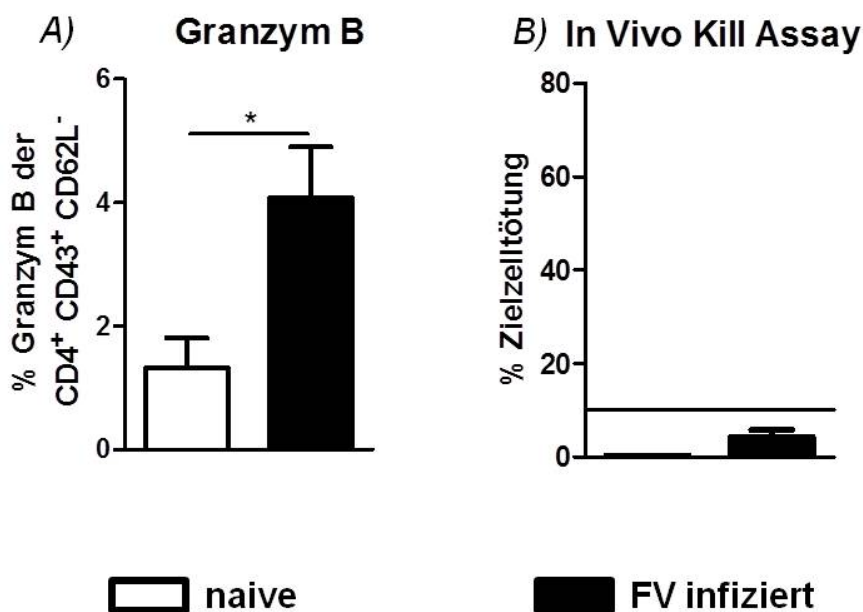


Abbildung 4.7 Zytotoxisches Potential von Effektor $CD4^+$ T-Zellen.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 10 Tage nach FV-Infektion getötet und Milzellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere analysiert. A) Prozentueller Anteil der GzmB exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation. B) Ergebnisse des In vivo Kill Assays. Prozentueller Anteil der abgetöteten Zielzellen durch $CD4^+$ T-Zellen akut infizierter Mäuse im Vergleich zu naiven Tieren. Es ist der prozentuale Anteil an Zielzell-spezifischer Elimination gezeigt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Der horizontale Balken in der Grafik symbolisiert das Detektionslimit dieses Tests von 10%. Der Unterschied zwischen den Gruppen wurde mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.5.3 Kinetik der Proliferation von Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen

Es ist bekannt, dass CD4⁺ Foxp3⁺ Tregs lokal begrenzt an Orten mit hoher Viruslast und in Abhängigkeit der Expansion von CD8⁺ Effektorzellen proliferieren (115). Im Unterschied zu einer Analyse mit BrdU, welches über einen längeren Zeitraum dem Futter zugesetzt, als DNA interkalierender Farbstoff alle bis zu diesem Zeitpunkt proliferierten Zellen markiert, markiert Ki67 ausschließliche jene Zellen, welche zum Analysezeitpunkt in der mitotischen Phase des Zellzyklus waren. Die Analyse des prozentuellen Anteils proliferierter Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen an der gesamten Population der Tregs in den Milzen naiver Tiere, sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach FV-Infektion zeigte, dass in naiven Mäusen ca. 20% der Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen proliferierten. Acht Tage nach Infektion waren es bereits 28% der Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen. Maximale Proliferation konnte an Tag 10 nach Infektion beobachtet werden. Hier befanden sich ca. 34% der Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen im Zellzyklus. In der chronischen Infektion nahm der Anteil der proliferierenden Tregs wieder ab und erreichte ein Niveau ähnlich dem naiver Tiere, von ca. 19,5% (Abbildung 4.8). Die Proliferation Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen erreichte also an Tag 10 nach FV-Infektion ihren Höhepunkt und fiel danach auf ihr Ausgangsniveau zurück.

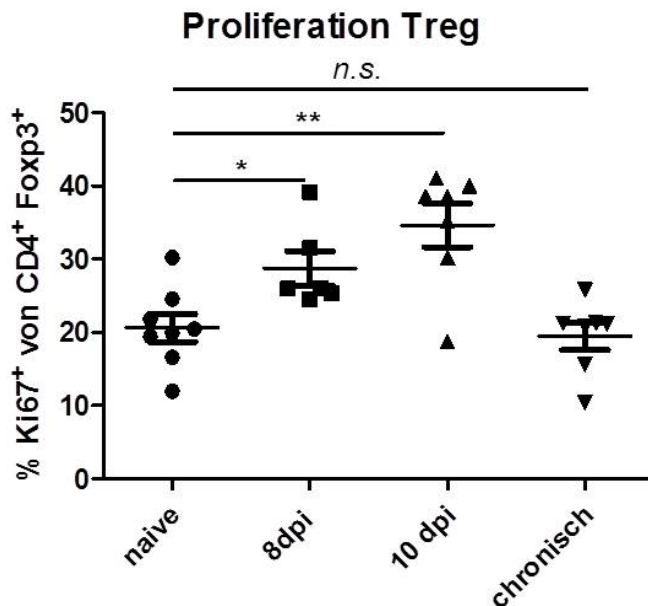


Abbildung 4.8 Kinetik der Proliferation der Foxp3⁺ CD4⁺ Tregs in der Milz.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 8, 10 und 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Milzzellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere analysiert. Gezeigt ist der prozentuelle Anteil der Ki67⁺ Zellen an den Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen. Jeder Punkt symbolisiert eine einzelne Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.5.4 Depletion von regulatorischen T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen während einer akuten FV-Infektion

Da bereits für CD8⁺ T-Zellen gezeigt werden konnte, dass ihr zytotoxisches Potential während der akuten Phase der FV-Infektion durch Tregs supprimiert wird, lag die Vermutung nahe, dass dies auch für CD4⁺ T-Zellen der Fall sein könnte. Aus diesem Grund wurden Tregs mit Hilfe des DEREK Mausmodells (1.3) durch die Injektion von Diphtherietoxin (DT) depletiert (Abbildung 4.9). Im Folgenden wurde die Auswirkung der Treg Depletion auf die Effektorfunktion der CD4⁺ T-Zellpopulation untersucht. Die Depletionseffizienz wurde durchflusszytometrisch bestätigt. Repräsentative FACS Dot-Plots zeigten den prozentualen Anteil GFP positiver CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation während der akuten Infektion. Hier waren 7,6% der CD4⁺ T-Zellen GFP⁺. Nach DT Behandlung waren die GFP⁺CD4⁺ T-Zellen größtenteils abwesend. Nur 0,24% waren verblieben (Abbildung 4.9B). Tregs in der Milz wurden also durch die DT Behandlung zu 97% depletiert.

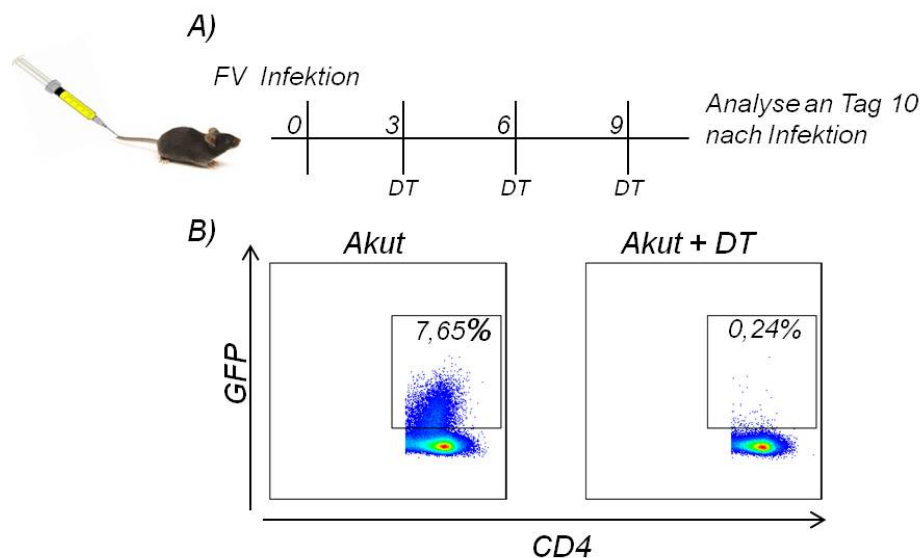


Abbildung 4.9 Selektive Depletion von Tregs in der akuten FV-Infektion.

A) Depletionschema zur selektiven Depletion von Tregs in DEREK Mäusen. Es wurde den Tieren dreimal im Abstand von drei Tagen, beginnend am dritten Tag nach akuter FV-Infektion, DT i.p. injiziert. (B) Repräsentative Dot-Plots einer akut infizierten Maus und einer akut infizierten und Treg depletierten Maus. Die prozentuelle Angabe in den Kästchen bezieht sich auf den Anteil GFP exprimierender Treg Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation.

Zusätzlich wurde der Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf die Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden CD8⁺ T-Zellen mittels eines i.p. injizierten CD8 spezifischen monoklonalen Antikörpers depletiert (Abbildung 4.10A).

Die Depletionseffizienz wurde an Tag 10 nach Infektion und erfolgter Depletion mittels CD8 Antikörperfärbung durchflusszytometrisch untersucht. Repräsentative FACS Dot-Plots zeigten, dass im naiven Tier ca. 14,5% der Lymphozyten CD8 positiv waren. Dieser Anteil stieg nach Infektion leicht an auf 17% (Abbildung 4.10B). Die Depletion der CD8⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion reduzierte den Anteil der CD8⁺ T-Zellen auf 1,62% an der gesamten Lymphozytenpopulation. Die Depletionseffizienz betrug somit 90,4%.

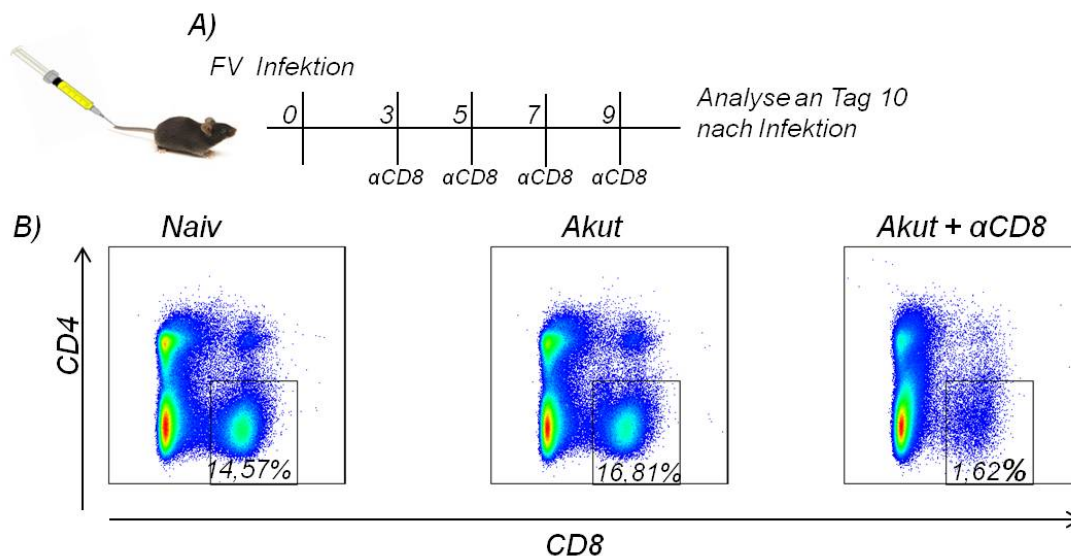


Abbildung 4.10 Selektive Depletion von CD8⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion.

A) Depletionschema der selektiven Depletion von CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe eines CD8 spezifischen monoklonalen Antikörpers. Dieser wurde vier Mal im Abstand von zwei Tagen beginnend an Tag 3 nach Infektion, i.p. injiziert. B) Repräsentative Dot-Plots der durchflusszytometrischen Analyse von Milzzellsuspensionen naiver Tiere, an Tag 10 nach FV-Infektion und nach Infektion bei gleichzeitiger Depletion der CD8⁺ T-Zellen. Die prozentuelle Angabe in den Kästchen bezieht sich auf den Anteil CD8⁺ T-Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulationen.

4.5.5 Einfluss von Tregs und CD8⁺ T-Zellen auf die Expansion der Effektor CD4⁺ T-Zellen

Die nachfolgende phänotypische Analyse der Effektor CD4⁺ T-Zellen erfolgte an Milzzellsuspensionen der verschiedenen depletierten und nicht depletierten Versuchsgruppen. Zunächst wurde die Auswirkung der verschiedenen Depletionen auf die Expansion der Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation untersucht (Abbildung 4.11A). Während nach akuter Infektion durchschnittlich 8% der CD4⁺ T-Zellen den Effektorphänotyp (CD43⁺, CD62L⁻) zeigen, nimmt ihr Anteil an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation zu und steigt nach Depletion der Tregs signifikant auf durchschnittlich

ca. 15% an. Die Depletion der CD8⁺ T-Zellen hatte dagegen keine weitere Expansion von CD4⁺ T-Zellen mit Effektorphänotyp zur Folge. In dieser Gruppe konnte im Gegenteil eine signifikante Reduktion der Effektor CD4⁺ T-Zellen auf durchschnittlich ca. 3,5% der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation beobachtet werden. In der Gruppe der doppelt depletierten Tiere hatten durchschnittlich 10% der CD4⁺ T-Zellen einen Effektorphänotyp. Dies entspricht einer signifikanten Erhöhung im Vergleich zur nicht depletierten Kontrollgruppe.

Anschließend wurde die Auswirkung der verschiedenen Depletionen auf die Expansion von FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen untersucht (Abbildung 4.11B). Es konnte gezeigt werden, dass nach Treg Depletion durchschnittlich 1,2% der CD4⁺ T-Zellen FV-spezifisch für das FV-Env H19 Epitop waren, wohingegen in den akut infizierten und nicht depletierten Mäusen nur 0,87% aller CD4⁺ T-Zellen Tet II positiv waren. Dies entspricht einer signifikanten Zunahme nach Depletion der Tregs. Die Depletion der CD8⁺ T-Zellen hatte keine Änderung der Zahl FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen zur Folge. Die doppelte Depletion von Tregs und CD8⁺ T-Zellen führte zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Steigerung des prozentualen Anteils FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen auf durchschnittlich 1,3%.

Beide Experimente zeigen, dass Tregs einen deutlich supprimierenden Einfluss auf die Expansion sowohl der FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellpopulation, als auch auf die gesamte CD4⁺ Effektorzellpopulation haben. Dies wird durch die massive Expansion beider CD4⁺ T-Zellpopulationen nach Treg Depletion deutlich. Der Einfluss der CD8⁺ T-Zellpopulation auf CD4⁺ T-Zellen scheint hingegen gering zu sein. Die kombinierte Depletion von Tregs und CD8⁺ T-Zellen hatte die Expansion von Effektor- und FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zur Folge. Im Falle der Tet II positiven CD4⁺ T-Zellen konnte eine stärkere Zunahme beobachtet werden, als bei der alleinigen Treg Depletion.

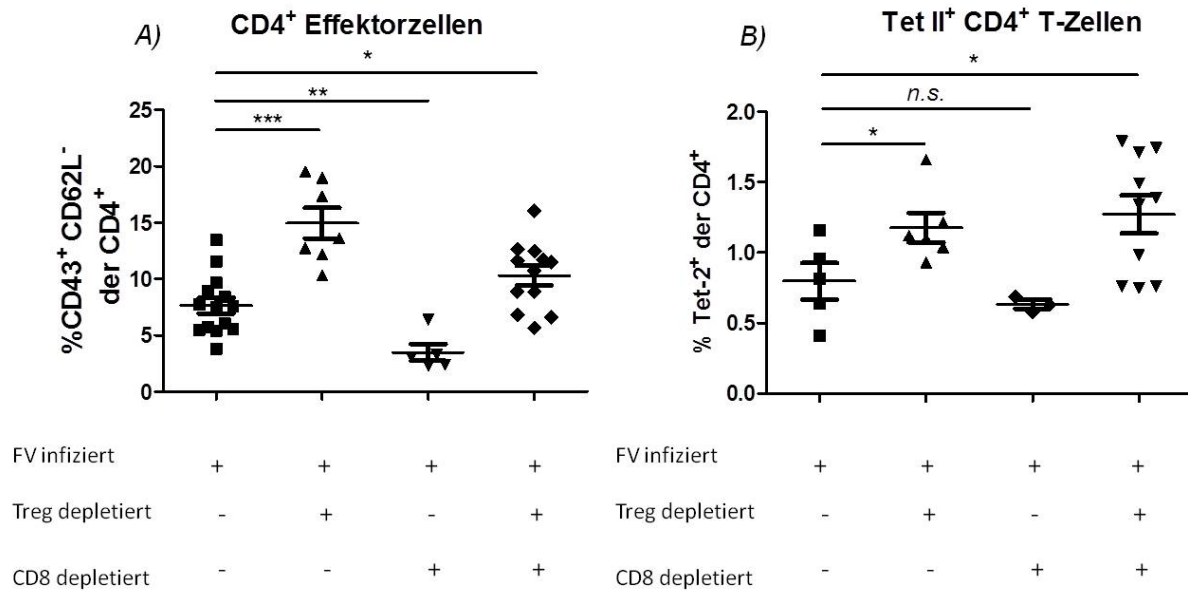


Abbildung 4.11 Einfluss von Tregs und CD8⁺ T-Zellen auf die Expansion von Effektor- und FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen.

Mit FV-infizierte C57BL/6 oder DREG Mäuse wurden mit DT behandelt um Tregs zu depletieren oder mit α CD8 behandelt, um CD8⁺ T-Zellen zu depletieren. Außerdem wurde eine Gruppe sowohl mit DT, als auch mit α CD8 behandelt, um beide Zellpopulationen zu depletieren. 10 Tage nach FV-Infektion wurden die Mäuse getötet und Milzzellsuspensionen dieser Tiere, sowie nur infizierter und naiver Tiere durchflusszytometrisch analysiert. A) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils CD43⁺ CD62L⁻ CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation. B) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils Tet II⁺ CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation. Jeder Punkt symbolisiert eine einzelne Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s.= nicht signifikant.

4.5.6 Auswirkung von Tregs und CD8⁺ T-Zellen auf die Effektorfunktion der CD4⁺ T-Zellen

Die Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen wird durch die Expression von Effektorzytokinen wie IFN- γ , IL-2 und IL-4 definiert. Die durchflusszytometrische Analyse der CD4 Effektorzellen zeigte, dass die Depletion von Tregs die Effektorfunktion von CD4⁺ T-Zellen steigert (Abbildung 4.12). Während Effektor CD4⁺ T-Zellen, die aus akut infizierten Mäusen isoliert wurden, zu durchschnittlich 2,5% IFN- γ exprimierten, wurde deren Anteil durch Depletion der Tregs signifikant auf durchschnittlich 12% erhöht (Abbildung 4.12A). Ähnliches war für die Produktion von IL-2 zu beobachten (Abbildung 4.12B). Nach Depletion der Tregs lag hier der durchschnittliche Anteil IL-2 exprimierender Zellen am gesamten Pool der Effektor

CD4⁺ T-Zellen bei 10%. Dies bedeutete eine signifikante Steigerung um 8%. Besonders deutlich wurde die Steigerung der IL-4 Produktion nach Depletion der Tregs (Abbildung 4.12C). Hier war bei Effektor CD4⁺ T-Zellen, die aus akut infizierten Mäusen isoliert wurden, kein Unterschied zu Effektor CD4⁺ T-Zellen aus naiven Mäusen detektierbar. Nach Depletion der Tregs kam es zu einer signifikanten Steigerung auf 3,2%. Die alleinige Depletion von CD8⁺ T-Zellen zeigte bei den untersuchten Zytokinen IFN- γ und IL-2 keine signifikante Änderung im Vergleich zu der nur FV-infizierten Kontrollgruppe (Abbildung 4.12A,B). Nur die Expression von IL-4 konnte durch die CD8 Depletion signifikant gesteigert werden (Abbildung 4.12C). Hier steigerte sich der Anteil von 0,4% auf 1,2%. Ähnlich der Depletion von Tregs, resultierte die doppelte Depletion von Tregs und CD8⁺ T-Zellen in einer Zunahme der Zytokin exprimierenden Zellen. 12% der Effektor CD4⁺ T-Zellen der doppelt depletierten Tiere exprimierten IFN- γ , 9% IL-2 und durchschnittlich 3,8% IL-4. Diese Ergebnisse zeigen, dass Tregs in der akuten FV-Infektion einen suppressiven Einfluss auf CD4⁺ T-Zellen haben. Allerdings führte die Depletion von CD8⁺ T-Zellen nicht zu einer Expansion von Effektor CD4⁺ T-Zellen oder zur Steigerung ihrer Funktionalität.

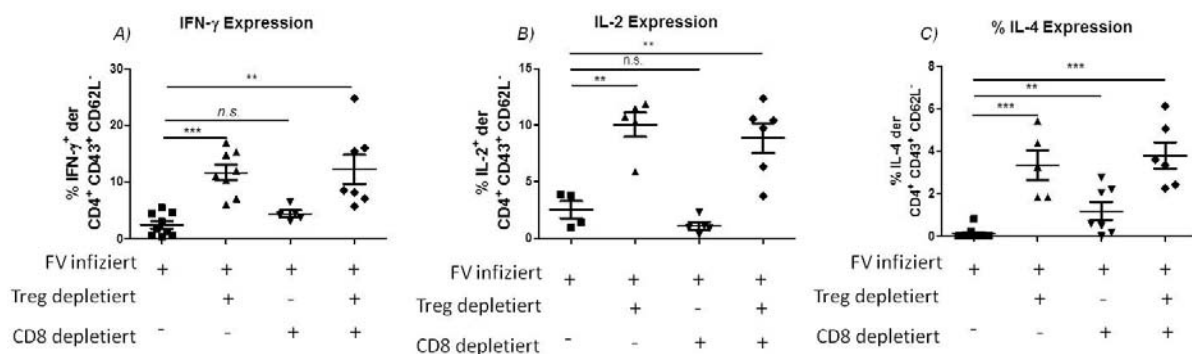


Abbildung 4.12 Einfluss von Tregs und CD8⁺ T-Zellen auf die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-4 durch CD4⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion.

Mit FV-infizierte C57BL/6 oder DEREK Mäuse wurden mit DT behandelt um Tregs zu depletieren oder mit α CD8 behandelt um CD8⁺ T-Zellen zu depletieren. Außerdem wurde eine Gruppe sowohl mit DT, als auch mit α CD8 behandelt um beide Zellpopulationen zu depletieren. 10 Tage nach FV-Infektion wurden die Mäuse getötet und Milzzellsuspensionen dieser Tiere, sowie nur infizierter und naiver Tiere durchflusszytometrisch analysiert. A) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils IFN- γ B) IL-2 oder. C) IL-4 exprimierender CD4⁺ T-Zellen an der gesamten Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation. Jeder Punkt symbolisiert eine einzelne Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005, *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.5.7 Die Rolle von Tregs und CD8⁺ T-Zellen bei der Kontrolle der zytotoxischen CD4⁺ T-Zellantwort

Genau wie die Zytokinexpression, ist auch die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion durch Tregs supprimiert (115). Da im oben beschriebenen Versuch gezeigt werden konnte, dass Tregs die Effektorfunktion der CD4⁺ T-Zellen supprimieren, sollte nun die Frage beantwortet werden, ob dies auch für die Zytotoxizität von Effektor CD4⁺ T-Zellen gilt. Zu diesem Zweck wurden Milzzellsuspensionen von 10 Tage infizierten Tieren der verschiedenen Depletionsgruppen durchflusszytometrisch untersucht. In der Gruppe der nur FV-infizierten Tiere exprimierten nur 2,3% der Effektor CD4⁺ T-Zellen das zytotoxische Molekül GzmB. Nach Treg Depletion steigerte sich der prozentuelle Anteil signifikant auf 6%. Wieder hatte die Depletion von CD8⁺ T-Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Funktion der CD4⁺ T-Zellen. Hier lag der prozentuelle Anteil bei durchschnittlich 3,5%. Eine signifikante Erhöhung des prozentuellen Anteils GzmB produzierender Effektor CD4⁺ T-Zellen hatte die doppelte Depletion von Tregs und CD8⁺ T-Zellen zur Folge. Hier steigerte sich ihr Anteil auf durchschnittlich 17% (Abbildung 4.13A). Den aussagekräftigsten Beweis für die Zytotoxizität von CD4⁺ T-Zellen liefert der beschriebene MHC-II restringierte In Vivo Kill Assay. Wie schon in Abbildung 4.7 gezeigt, war das zytotoxische Potential der CD4⁺ T-Zellen in den Milzen FV-infizierter Mäuse unterhalb des Detektionslimits von 10%. Die Depletion von Tregs oder CD8⁺ T-Zellen alleine hatte keinen signifikant förderlichen Einfluss auf das zytotoxische Potential der CD4⁺ Effektor T-Zellen. Wie schon für die Expression von GzmB beobachtet, hatte allein die Doppeldepletion von Treg und CD8⁺ T-Zellen einen signifikanten Einfluss auf das zytotoxische Potential der CD4⁺ T-Zellen. In dieser Gruppe stieg der prozentuelle Anteil abgetöteter Zellen auf durchschnittlich 40% an (Abbildung 4.13B). Diese Ergebnisse beweisen, dass die zytotoxische Funktion der FV-induzierten Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation sowohl durch Tregs, als auch durch CD8⁺ T-Zellen supprimiert wird.

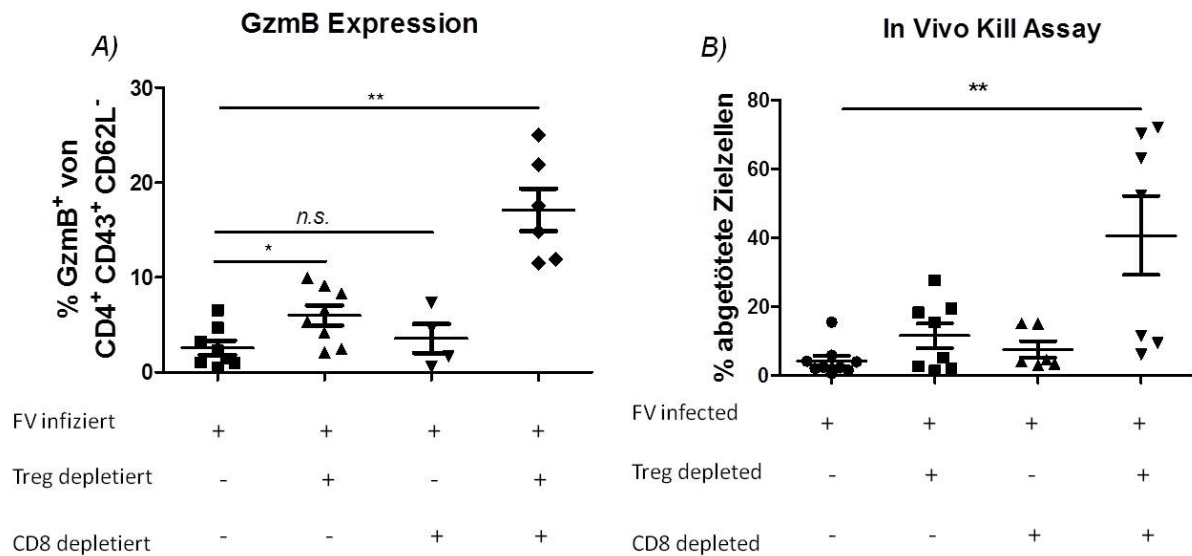


Abbildung 4.13 Einfluss von Tregs und CD8⁺ T-Zellen auf das zytotoxische Potential von CD4⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion.

Mit FV-infizierte C57BL/6 oder DREG Mäuse wurden mit DT behandelt, um Tregs zu depletieren oder mit α CD8 behandelt, um CD8⁺ T-Zellen zu depletieren. Außerdem wurde eine Gruppe sowohl mit DT, als auch mit α CD8 behandelt, um beide Zellpopulationen zu depletieren. 10 Tage nach FV-Infektion wurden die Mäuse getötet und Milzzellsuspensionen dieser Tiere, sowie nur infizierter und naiver Tiere durchflusszytometrisch analysiert. A) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils GzmB exprimierender CD4⁺ T-Zellen an der gesamten Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation. B) In vivo Zytotoxizität von CD4⁺ T-Zellen. Es ist der prozentuale Anteil an zielzell-spezifischer Elimination gezeigt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.5.8 Auswirkung der in vivo Stimulation mit anti-CD137 auf die Expansion der Effektor-, sowie FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

In Bezug auf die suppressive Wirkung von CD8⁺ T-Zellen zeigen neueste Erkenntnisse aus Tumormodellen, dass hier möglicherweise der Transkriptionsfaktor Eomesodermin eine Rolle spielen könnte. Dieser fördert die Entwicklung der entsprechenden Zellen hin zu einer zytotoxischen Funktion. Eomesodermin wird durch Ligandenbindung der stimulierenden Rezeptoren CD134 und CD137 induziert und sowohl von CD4⁺ -, als auch von CD8⁺ T-Zellen expremiert.

Da die beiden genannten Rezeptoren auf CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen expremiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass beide Zellpopulationen um den Liganden konkurrieren.

Um diese These zu überprüfen, wurde ein *in vivo* Stimulationsexperiment mit agonistischem anti-CD137 durchgeführt. Anti-CD137 wurde jeden zweiten Tag *i.p.* injiziert und zwar sowohl in FV-infizierte, als auch in FV-infizierte und CD8 depletierte Mäuse. Zunächst wurde untersucht, ob die Gabe von anti-CD137 allein oder in Kombination mit der Depletion von CD8⁺ T-Zellen den prozentuellen Anteil aktivierter, bzw. FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation erhöht. Es zeigte sich, dass sich der Anteil der Effektorzellen durch Gabe von anti-CD137 von durchschnittlich 10% in der FV-Infektion ohne Stimulation auf 17% nach Gabe von anti-CD137 erhöhte (Abbildung 4.14A). CD137 Antikörper in Kombination mit der Depletion von CD8⁺ T-Zellen führte zu einer weiteren Erhöhung des Anteils der Effektor CD4⁺ T-Zellen auf durchschnittlich 17,5%. Ähnliche Ergebnisse wurden für den Anteil FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation gewonnen. Stimulation mit anti-CD137 verursachte eine Zunahme der Tet II⁺ CD4⁺ T-Zellen auf durchschnittlich 2% im Vergleich zu 1,5% in der nur FV-infizierten Kontrollgruppe. Die zusätzliche Depletion von CD8⁺ T-Zellen führte zu einer weiteren Zunahme des Anteils FV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen auf 2,2% (Abbildung 4.14C). Abbildung 4.14D zeigt die Detektion FV-spezifischer Tet II⁺ CD4⁺ T-Zellen in den verschiedenen Versuchsgruppen im Durchflusszytometer.

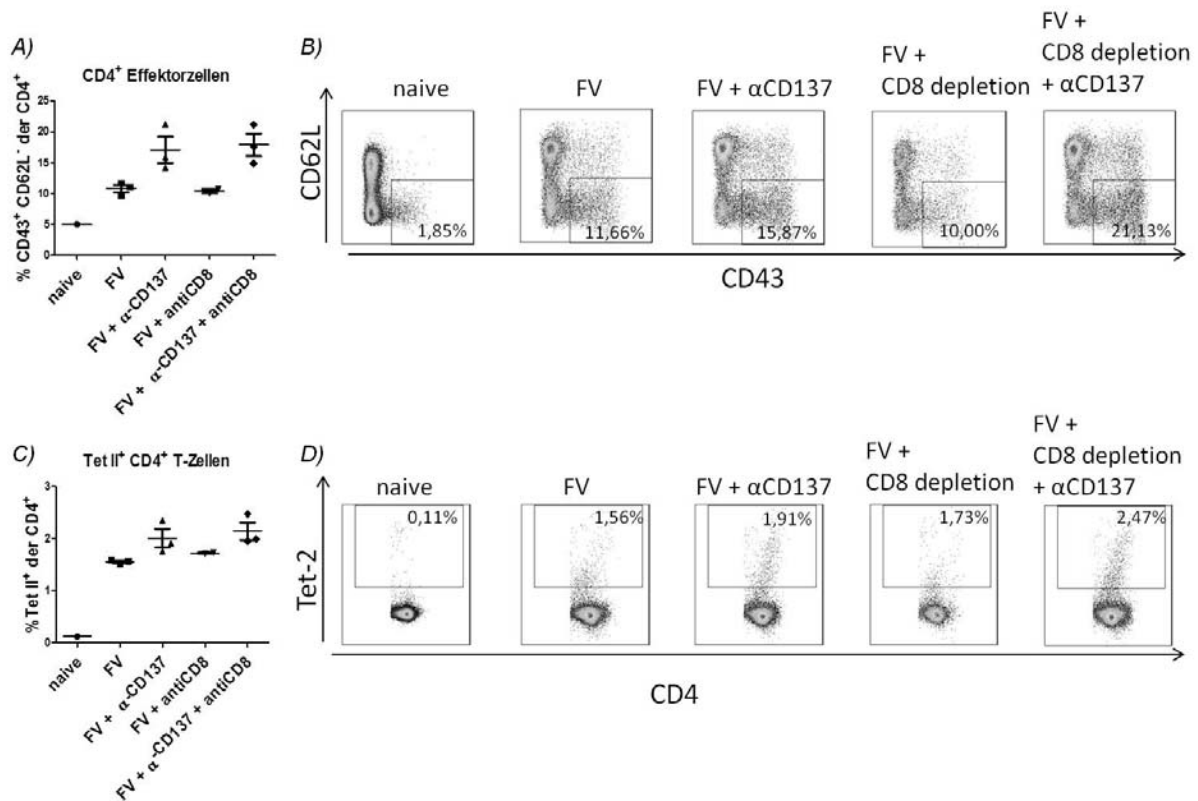


Abbildung 4.14 Effekt der In Vivo Stimulation des CD137 Rezeptors auf die Expansion von Effektor CD4⁺ T-Zellen und FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen.

Agonistische anti-CD137 Antikörper wurden FV-infizierten oder FV-infizierten und CD8⁺ T-Zell depletierten Mäusen i.p. injiziert. Als Kontrollgruppen fungierten naive-, nur FV-infizierte-, sowie FV-infizierte und CD8 depletierte Mäuse. A) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils der CD43⁺ CD62L⁻ CD4⁺ Effektorzellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation. B) repräsentative Dot-Plots dieser Analyse. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil der Effektorzellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation. C) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils der FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. D) repräsentative Dot-Plots dieser Analyse. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil der FV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation.

4.5.9 Auswirkung der in vivo Stimulation mit anti-CD137 auf die Zytokinproduktion der Effektor CD4⁺ T-Zellen

Nachdem also bewiesen werden konnte, dass anti-CD137 einen stimulierenden Effekt auf die Expansion von Effektor CD4⁺ T-Zellen hat und dies besonders in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen, wurde untersucht, ob dies auf die Funktionalität der CD4⁺ T-Zellen zutrifft. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen der genannten Gruppen auf die Expression von IFN-γ und IL-2 durchflusszytometrisch untersucht. Die Antikörperstimulation mit anti-CD137 führte zu einer deutlichen Steigerung des Anteils IFN-γ exprimierender Zellen von durchschnittlich 12% in der nur FV-infizierten Gruppe, auf ca. 38% in der infizierten und stimulierten Gruppe. Die

zusätzlich durchgeführte Depletion der $CD8^+$ T-Zellen führte sogar zu einer Steigerung auf durchschnittlich 43% (Abbildung 4.15A). Eine ähnliche Auswirkung hatte die *in Vivo* Stimulation auf die Expression des Zytokins IL-2. 8,2% der Effektor $CD4^+$ T-Zellen exprimierten IL-2 nach FV-Infektion. Die Stimulation mit anti-CD137 erhöhte diesen Anteil auf durchschnittlich 13%. In der Versuchsgruppe, die zusätzlich mit anti-CD8 behandelt wurde, konnte sogar eine durchschnittliche Expression von ca. 28% detektiert werden (Abbildung 4.15C). Die Abbildung 4.15B (IFN- γ) und C (IL-2) zeigen exemplarische Dot-Plots der verschiedenen Versuchsgruppen.

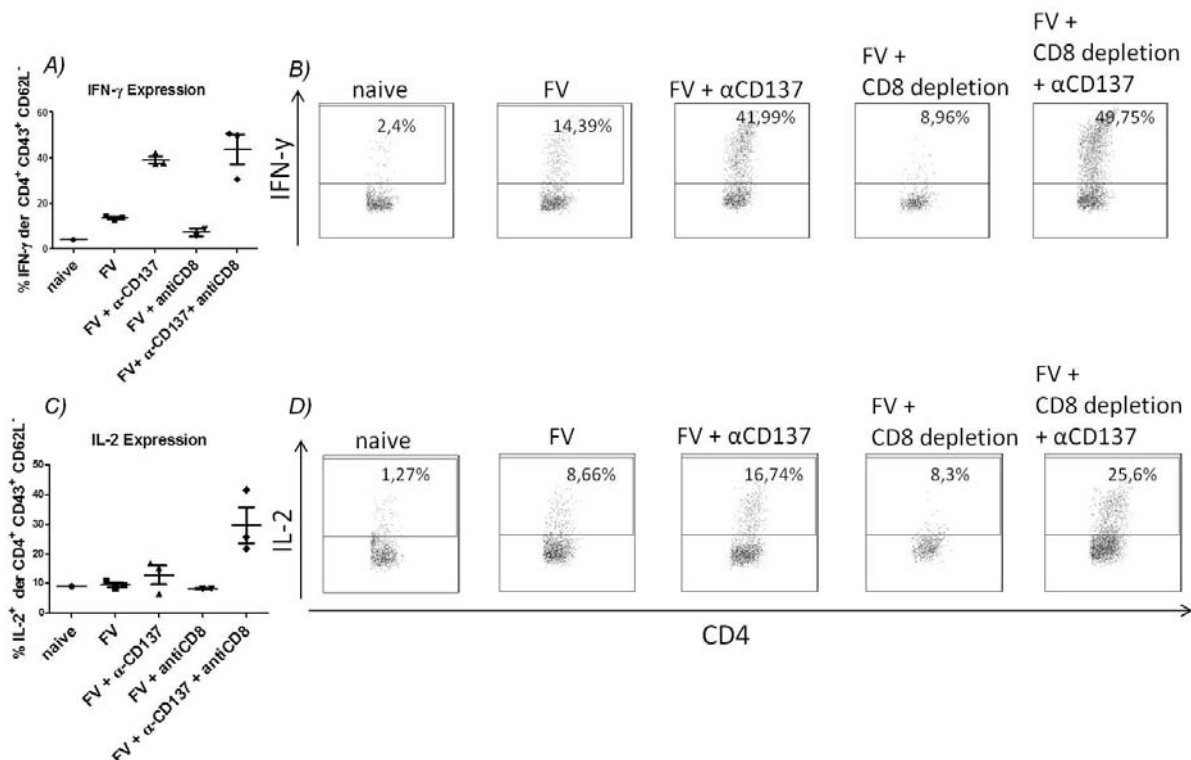


Abbildung 4.15 Effekt der *In Vivo* Stimulation des CD137 Rezeptors auf die Expression der Zytokine IFN- γ und IL-2 in $CD4^+$ T-Zellen.

Agonistische anti-CD137 Antikörper wurden FV-infizierten oder FV-infizierten und $CD8^+$ T-Zelldepletierten Mäusen *i.p.* injiziert. Als Kontrollgruppen fungierten naive-, nur FV-infizierte- und FV-infizierte und CD8 depletierte Mäuse. A) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils der IFN- γ produzierenden $CD4^+$ Effektorzellen. B) repräsentative Dot-Plots dieser Analyse. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil der IFN- γ produzierender $CD4^+$ T-Zellen an der gesamten $CD4^+$ Effektorzellpopulation. C) Graphische Darstellung des prozentuellen Anteils der IL-2 produzierende $CD4^+$ Effektorzellen. D) repräsentative Dot-Plots dieser Analyse. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil der IL-2 produzierender $CD4^+$ T-Zellen an der gesamten $CD4^+$ Effektorzellpopulation.

4.5.10 Auswirkung der in vivo Stimulation mit anti-CD137 auf das zytotoxische Potential der Effektor CD4⁺ T-Zellen

Abschließend sollte der Effekt der CD137 Stimulation auf die Expression zytotoxischer Moleküle wie GzmB, untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit anti-CD137 den Anteil GzmB produzierender CD4⁺ T-Zellen von 1% in der Gruppe akut FV-infizierter Tiere auf rund 6% steigerte. Die zusätzliche Depletion der CD8⁺ T-Zellen führte zu einer weiteren Steigerung auf knapp 10% der Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation (Abbildung 4.16A). In Abbildung 14B sind repräsentative Dot-Plots der GzmB Expression in Effektor CD4⁺ T-Zellen der verschiedenen Gruppen dargestellt.

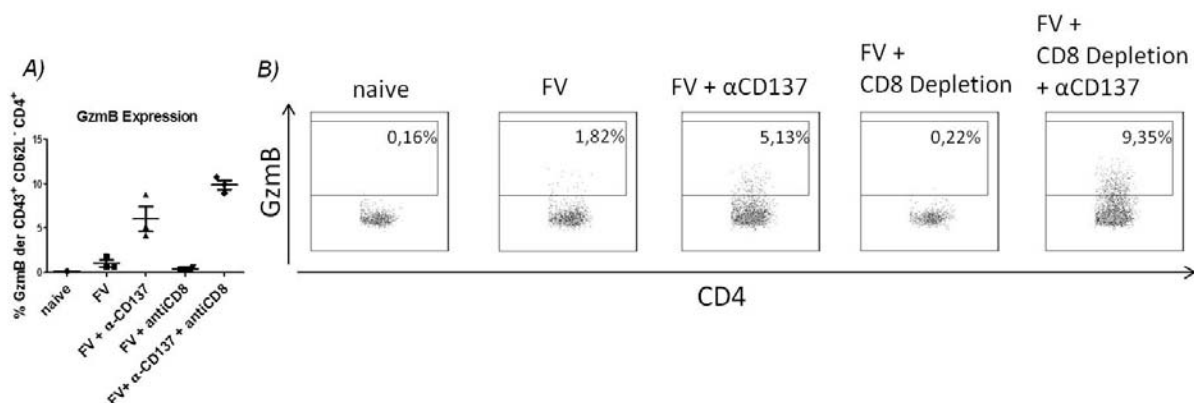


Abbildung 4.16 Effekt der In Vivo Stimulation des CD137 Rezeptors auf die Expression des zytotoxischen Moleküls GzmB von CD4⁺ T-Zellen.

Agonistische anti-CD137 Antikörper wurden FV-infizierten oder FV-infizierten und CD8⁺ T-Zelldepletierten Mäusen i.p. injiziert. Als Kontrollgruppen dienten naive-, nur FV-infizierte- und FV-infizierte und CD8 depletierte Mäuse. A) Graphische Darstellung der Ergebnisse für den prozentuellen Anteil der GzmB produzierenden CD4⁺ Effektorzellen. B) repräsentative Dot-Plots dieser Analyse. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil der GzmB produzierender CD4⁺ T-Zellen an der gesamten CD4⁺ Effektorzellpopulation.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Stimulation mit agonistischem anti-CD137 die Expansion virusspezifischer CD4⁺ T-Zellen, der Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation, sowie deren Potential proinflammatorische Zytokine und zytotoxische Moleküle, wie GzmB zu exprimieren induzierte. Besonders in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen konnte eine deutliche Verbesserung der Funktion von CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass CD4⁺ T-Zellen durch Stimulation des CD137 Rezeptors verstärkt zu zytotoxischen Effektorzellen differenzieren und dass die Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen einen indirekt supprimierenden Effekt auf die Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation ausübt.

4.5.11 Einfluss von zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen auf die Viruslast

Um die Rolle der CD4⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion abschließend zu definieren, wurde die Auswirkung dieser Zellen auf die Viruslast im Infectious Center Assay untersucht (Abbildung 4.17). Dazu wurden verschiedene Zellpopulationen während der akuten FV-Infektion depletiert. Es ist bekannt, dass die Hauptviruslast während der akuten FV-Infektion im Knochenmark und der Milz zu detektieren ist (115). Ausgehend von einer Viruslast von ca. 2×10^5 infizierter Zellen pro Milz, verringerte sich die Viruslast, wie bereits publiziert (115), durch Depletion der Tregs signifikant auf $2,9 \times 10^4$ infizierter Zellen pro Milz. Dieser Effekt ist, wie beschrieben, auf eine verbesserte CD8⁺ T-Zellantwort zurückzuführen. Eine Depletion der CD8⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion bewirkte eine signifikante Zunahme der Viruslast auf durchschnittlich $1,8 \times 10^6$ infizierter Zellen pro Milz. Im Vergleich hierzu konnte durch die doppelte Depletion von Tregs und CD8⁺ T-Zellen eine signifikante Reduktion der Viruslast auf ca. $2,6 \times 10^5$ beobachtet werden. In dieser Versuchsgruppe liegt der Wert der Viruslast also wieder nahe am Ausgangswert der ausschließlich FV-infizierten Tiere. Dies deutet darauf hin, dass CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit der sonst in der akuten FV-Infektion so wichtigen CD8⁺ T-Zellen und in Abwesenheit der supprimierenden Wirkung der Tregs eine direkte antivirale Funktion übernehmen können. Um diese These weiter zu bestätigen, wurden zwei weitere Versuchsgruppen untersucht. In einer Gruppe wurden Tregs, CD8⁺- und CD4⁺ T-Zellen depletiert. Es zeigte sich, dass die Viruslast in dieser Gruppe signifikant höher war als in der Gruppe der Treg- und CD8 depletierten Tiere. In der dreifach depletierten Gruppe stieg die Viruslast in der Milz auf $7,3 \times 10^6$ infizierter Zellen pro Milz an. Dies bedeutet, dass der Unterschied zwischen der Treg- und CD8⁺ T-Zell depletierten Gruppe und der dreifach depletierten Gruppe eindeutig auf die zytotoxische Effektorfunktion der CD4⁺ T-Zellpopulation zurückzuführen war. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass CD4⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion eindeutig ein zytotoxisches Potential haben, welches allerdings durch Tregs supprimiert und durch CD8⁺ T-Zellen beeinflusst wird.

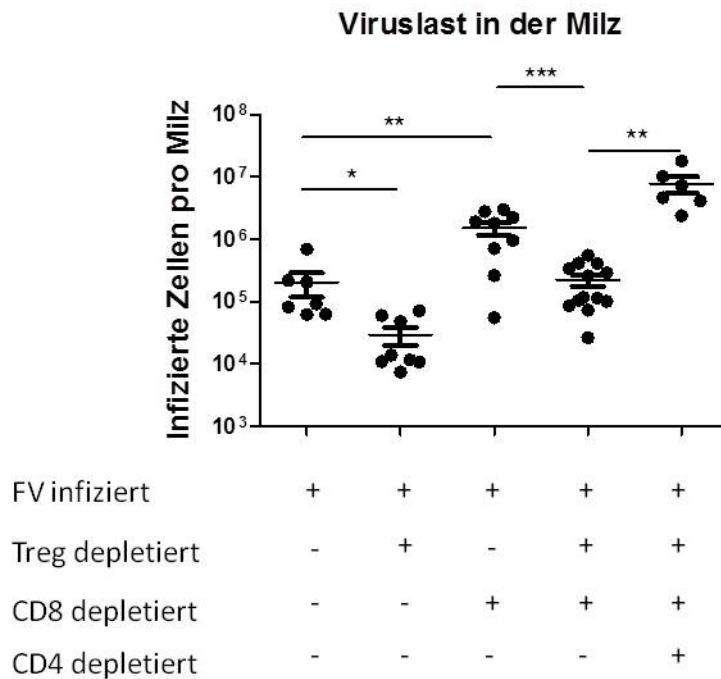


Abbildung 4.17 Viruslast in der Milz während der akuten FV-Infektion nach T-Zelldepletion.

Mäuse wurden mit FV-infiziert und die Viruslast in der Milz 10 Tage nach Infektion mittels Infectious Center Assay analysiert. Es wurden FV-infizierte, FV-infizierte und Treg depletierte, FV-infizierte und CD8⁺ T-Zell depletierte, FV-infizierte und Treg- + CD8⁺ T-Zell depletierte, sowie FV-infizierte und Treg- + CD8⁺ + CD4⁺ T-Zell depletierte Mäuse analysiert. Die absolute Anzahl von Virus-infizierten Zellen pro Milz ist dargestellt. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s.= nicht signifikant.

4.6 Funktionelle Analyse von Effektor CD4⁺ T-Zellen in der chronischen FV-Infektion

4.6.1 Analyse der Expansion von Effektor CD4⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion

Unter physiologischen Umständen wird die akute FV-Infektion durch die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T-Zellen kontrolliert. Dennoch kommt es zur Etablierung einer chronischen Infektion. Dies liegt an der supprimierenden Funktion von Tregs, welche die CD8⁺ T-Zellen in der späten Phase der akuten Infektion funktionell abschalten. In der chronischen Infektion, nach ca. 6 Wochen, ist die Viruslast auf einem konstant niedrigen Niveau. Allerdings ist hier nicht mehr das Knochenmark das Organ mit der höchsten Viruslast, sondern die Lymphknoten (24). Es gibt Hinweise, dass CD4⁺ T-

Zellen die Kontrolle über die chronische Infektion vermitteln (42). Ausgehend von den Ergebnissen der phänotypischen und funktionellen Analyse der $CD4^+$ T-Zellen in der akuten FV-Infektion sollte nun überprüft werden, ob $CD4^+$ T-Zellen tatsächlich für diese Kontrolle verantwortlich sind.

Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit 40000 SFFU FV infiziert. Im Folgenden wurden die Experimente an Tag 60 nach FV-Infektion durchgeführt und es wurden die Organe mit der höchsten chronischen Viruslast, nämlich Milz und Lymphknoten analysiert. Der prozentuelle Anteil der Effektor $CD4^+$ T-Zellen ($CD43^+ CD62L^-$) an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation stieg in der Milz von 2% in der naiven Kontrollgruppe, auf 6,5% in der Gruppe der chronisch infizierten Mäuse (Abbildung 4.18A). In den Lymphknoten nahm der Anteil von 3,5% auf 6% zu (Abbildung 4.18B).

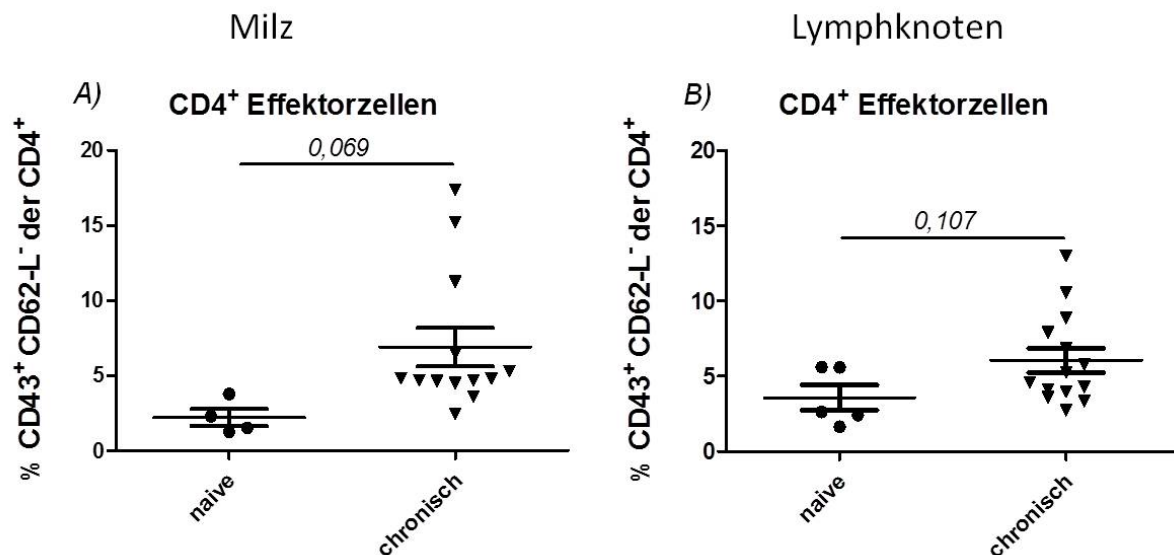


Abbildung 4.18 Auswirkung der chronischen FV-Infektion auf die Expansion von Effektor $CD4^+$ T-Zellen in Milz und Lymphknoten.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Zellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere wurden durchflusszytometrisch analysiert. A) Ergebnisse für $CD4^+$ T-Zellen aus Milzen, B) Ergebnisse für $CD4^+$ T-Zellen aus Lymphknoten. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

4.6.2 Analyse der Expansion von FV-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion

Für die Expansion FV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen zeigte sich in der Milz eine Zunahme von durchschnittlich 0,56% aller $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 4.19A). In den

Lymphknoten kam es zu einer signifikanten Steigerung des prozentuellen Anteils FV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation von 0,15% auf 0,5% (Abbildung 4.19B).

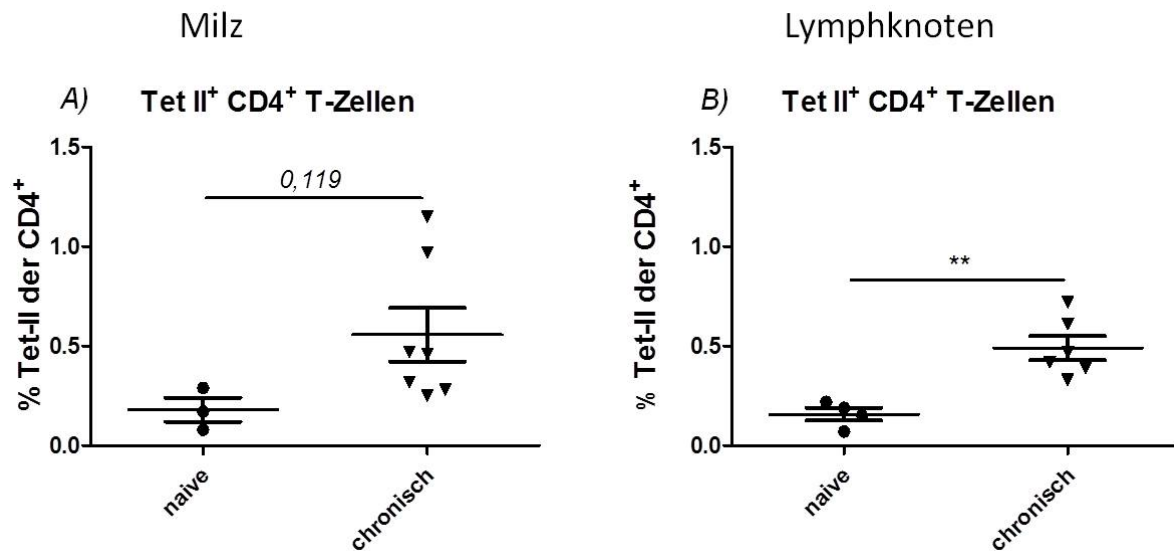


Abbildung 4.19 Expansion der FV-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen nach chronischer FV-Infektion im Vergleich zu naiven Tieren.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Zellsuspensionen dieser Tiere, sowie naive Tiere wurden durchflusszytometrisch analysiert. A) Ergebnisse für $CD4^+$ T-Zellen von Milzzellsuspensionen, B) Ergebnisse für $CD4^+$ T-Zellen aus Lymphknotensuspensionen. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s.= nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass virusspezifische $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen Infektion expandieren. Es stellte sich daher die Frage, ob $CD4^+$ T-Zellen, genau wie $CD8^+$ T-Zellen (24) während der chronischen FV-Infektion durch Tregs funktionell supprimiert werden.

4.6.3 Selektive Depletion von Tregs während der chronischen FV-Infektion

Aus diesem Grund wurden Tregs in chronisch infizierten Mäusen acht Tage vor der Untersuchung depletiert (Abbildung 4.20). Die Effizienz der Depletion wurde durch Kontrollfärbungen bestätigt. In der chronisch infizierten DEREK Maus waren 8,78% aller $CD4^+$ T-Zellen GFP⁺ (linker Dot Plot der Abbildung 4.20B). Nach DT Behandlung waren nur noch 0,23% der $CD4^+$ T-Zellen GFP⁺ (rechter Dot Plot der Abbildung

4.20B). Somit wurden durch die DT Behandlung in der chronischen Infektion 97% der $\text{GFP}^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen depletiert.

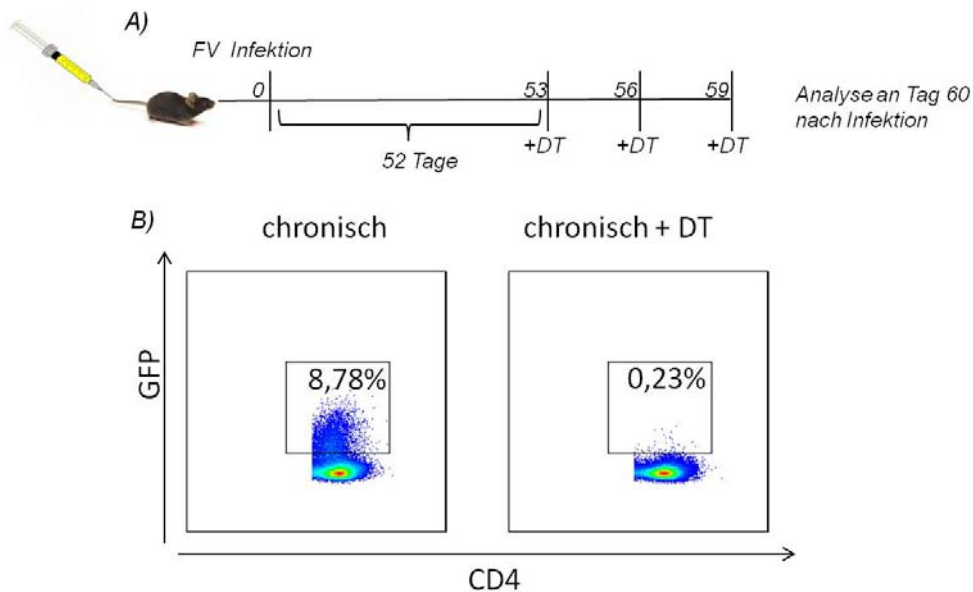


Abbildung 4.20 Selektive Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen FV-Infektion.

A) Für die Depletion der regulatorischen T-Zellen in DEREK Mäusen wurde den Tieren dreimal im Abstand von drei Tagen, beginnend am 53. Tag nach FV-Infektion, DT i.p. injiziert. Die Analyse der Milzzellsuspensionen wurde an Tag 60 nach FV-Infektion durchflusszytometrisch durchgeführt (B). Hierbei wurde auf die Anwesenheit von $\text{CD4}^+ \text{GFP}^+$ regulatorischen T-Zellen geachtet. Die Prozentzahl in den Kästen gibt den prozentuellen Anteil $\text{CD4}^+ \text{GFP}^+$ T-Zellen an der gesamten CD4^+ T-Zellpopulation wieder. Die Dot Plots stehen exemplarisch für alle durchgeführten Depletionen in der chronischen Infektion.

4.6.4 Auswirkung der Treg Depletion auf die Expansion von CD4^+ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion

Um zu klären, ob die detektierten FV-spezifischen Effektor CD4^+ T-Zellen proliferierten, wurden Proliferationsanalysen mit dem Marker Ki67 durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den naiven Tieren ca. 8% der CD4^+ T-Zellen der Milz zum Zeitpunkt der Untersuchung proliferierten. Im Vergleich hierzu konnte in den chronisch infizierten Tieren keine gesteigerte Proliferation detektiert werden. Nach Depletion der Tregs kam es zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation der CD4^+ T-Zellen auf durchschnittlich 23% (Abbildung 4.21A). Sehr ähnlich waren die Ergebnisse der CD4^+ T-Zellen in den Lymphknoten. 8% der naiven Zellen waren positiv für Ki67 und 9,7% der Zellen aus chronisch infizierten Tieren. Nach Depletion

der Tregs stieg die Zahl proliferierender $CD4^+$ T-Zellen in den Lymphknoten signifikant auf 30% an (Abbildung 4.21C).

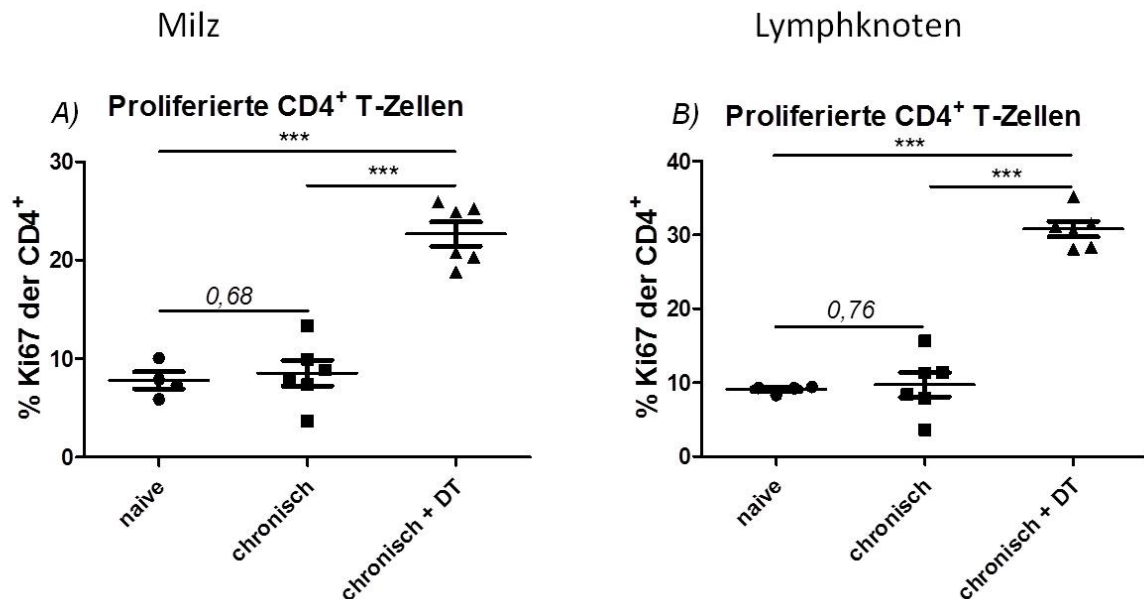


Abbildung 4.21 Proliferierende $CD4^+$ T-Zellen in naiven, chronisch infizierten, sowie chronisch infizierten und Treg depletierten Mäusen.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Zellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere wurden durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden die $CD4^+$ T-Zellen aus Milz- (A) und Lymphknotensuspensionen (B) auf die Expression von Ki67 untersucht und als prozentueller Anteil an der gesamten $CD4^+$ T-Zellpopulation angegeben. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s.= nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen in der chronischen Infektion durch Tregs supprimiert wird.

4.6.5 Analyse der Zytokinexpression von Effektor $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob auch die Effektorfunktion von $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen Infektion supprimiert wird, wurde die Expression verschiedener Zytokine nach Depletion von Tregs untersucht. Für die Expression von IFN- γ war in der chronischen Infektion kein signifikanter Unterschied zwischen den $CD4^+$ Effektor T-Zellen der Milzen der naiven (durchschnittlich 2,2%) und der chronisch infizierten (durchschnittlich 3,3%) Gruppe zu beobachten. Nach Depletion der Tregs konnte ein Anstieg auf durchschnittlich 5,8% beobachtet werden, welcher

allerdings im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe ebenfalls nicht signifikant war (Abbildung 4.22A). Bei den $CD4^+$ Effektor T-Zellen der Lymphknoten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der naiven- und der chronisch infizierten Mäuse festgestellt werden. Bei den naiven Tieren lag der prozentuelle Anteil der $IFN-\gamma$ exprimierenden Effektor $CD4^+$ T-Zellen an den gesamten Effektor $CD4^+$ T-Zellen bei durchschnittlich 1% und bei den chronisch infizierten Tieren bei durchschnittlich 2% (Abbildung 4.22B). Durch die Depletion der Tregs konnte eine Zunahme auf durchschnittlich 3,7% beobachtet werden, was sowohl im Vergleich zu den naiven, als auch zu den chronisch infizierten Tieren signifikant war.

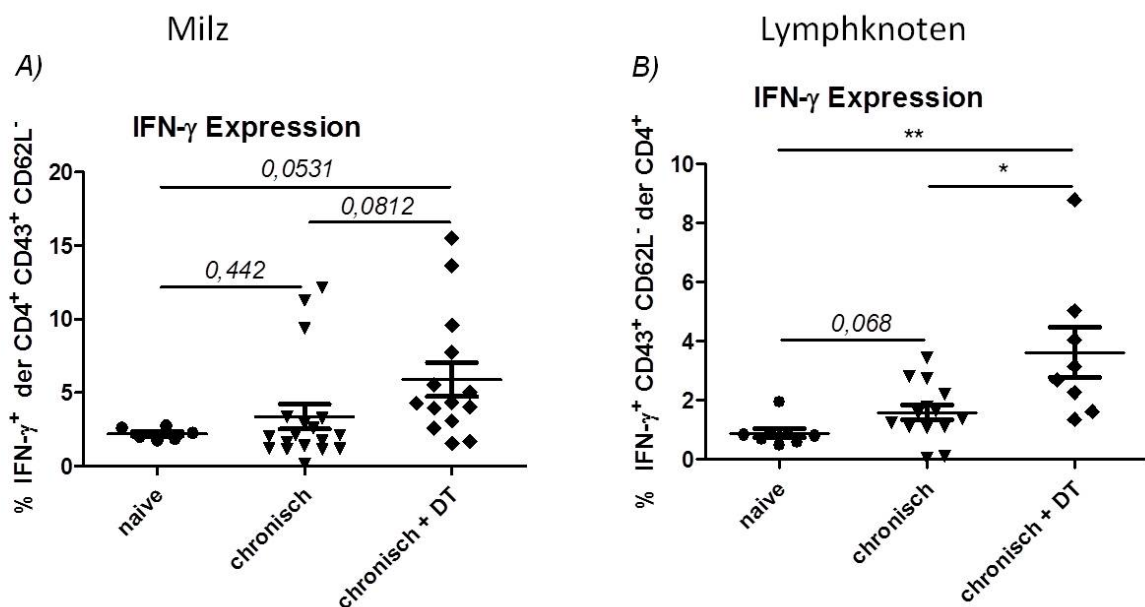


Abbildung 4.22 Einfluss von Tregs auf die $IFN-\gamma$ Expression durch $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Zellsuspensionen dieser Tiere, sowie naive Tiere wurden durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden die Effektor $CD4^+$ T-Zellen aus Milz (A) und Lymphknoten (B) durchflusszytometrisch auf die Expression von $IFN-\gamma$ analysiert und als prozentuellen Anteil $IFN-\gamma$ exprimierender $CD4^+$ T-Zellen an der gesamten Effektor $CD4^+$ T-Zellpopulation angegeben. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s.= nicht signifikant.

Des Weiteren wurde das Zytokin $IL-2$ untersucht. Auch hier zeigte sich, dass die chronische Infektion allein nicht zu einer signifikanten Steigerung der Expression durch Effektor $CD4^+$ T-Zellen führte (Abbildung 4.23). In beiden untersuchten Organen lag der Anteil der $IL-2$ exprimierenden Effektor $CD4^+$ T-Zellen bei

durchschnittlich 2,7%. In den chronisch infizierten Tieren exprimierten in beiden untersuchten Organen 3,3% der Effektor $CD4^+$ T-Zellen IL-2. In Abwesenheit der Tregs erhöhte sich der prozentuelle Anteil IL-2 exprimierender Effektor $CD4^+$ T-Zellen in beiden Organen signifikant auf durchschnittlich 6%.

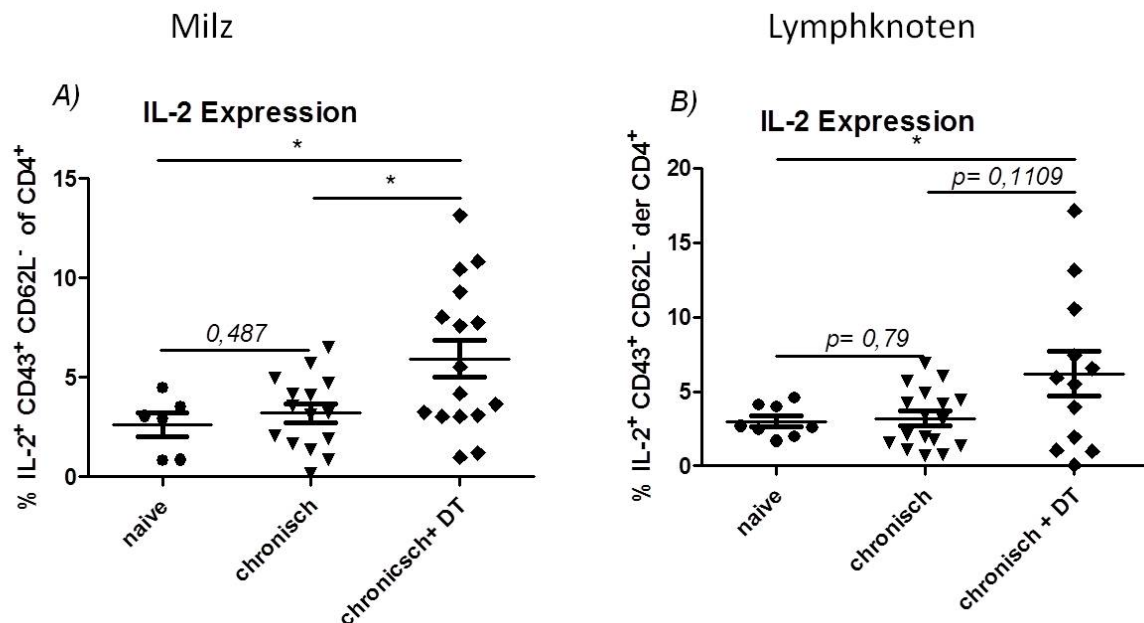


Abbildung 4.23 Einfluss von Tregs auf die IL-2 Expression durch $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Zellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere wurden durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden die Effektor $CD4^+$ T-Zellen aus Milz (A) und Lymphknoten (B) durchflusszytometrisch auf die Expression von IL-2 analysiert und als prozentuellen Anteil IL-2 exprimierender $CD4^+$ T-Zellen an der gesamten Effektor $CD4^+$ T-Zellpopulation angegeben. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s.= nicht signifikant.

Das letzte untersuchte Zytokin war TNF- α (Abbildung 4.24). In den Milzen naiver Mäuse wurde TNF- α von durchschnittlich 4% der Effektor $CD4^+$ T-Zellen und in den Lymphknoten von durchschnittlich 6,4% der Effektor $CD4^+$ T-Zellen exprimiert. In der chronischen Infektion lag der prozentuelle Anteil in der Milz bei durchschnittlich 5,7% und in den Lymphknoten bei durchschnittlich 6%. Nach Depletion der Tregs lag der Anteil TNF- α exprimierender Effektor $CD4^+$ T-Zellen bei durchschnittlich 7,5% in der Milz und durchschnittlich 8,1% in den Lymphknoten. Diese Veränderungen nach Infektion oder Infektion und Treg Depletion waren nicht signifikant.

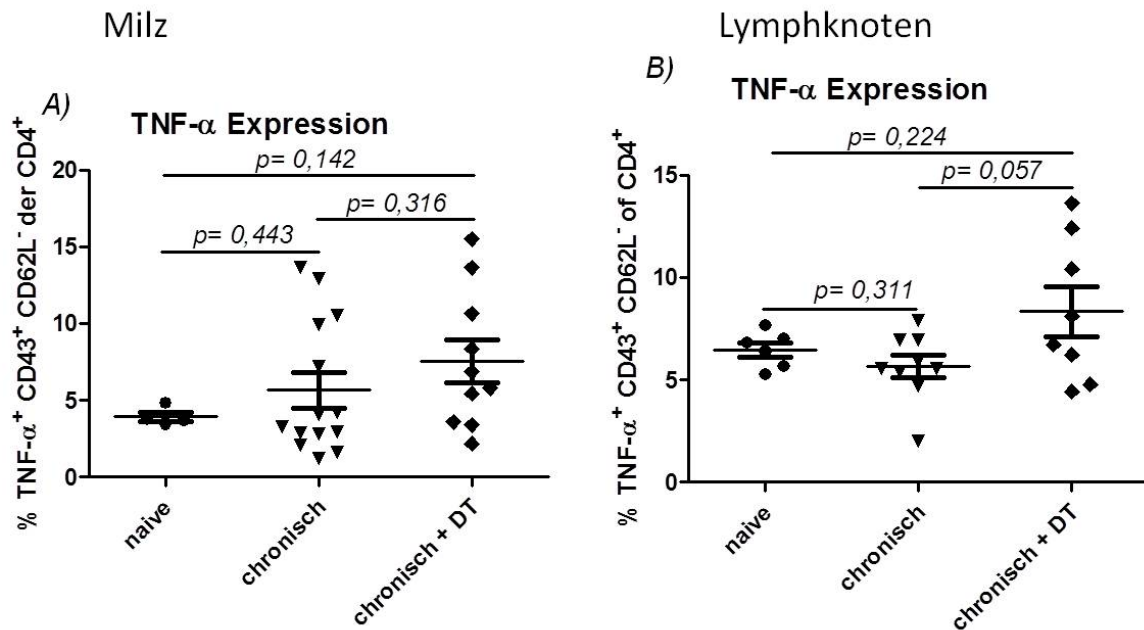


Abbildung 4.24 Einfluss von Tregs auf die TNF-α Expression durch CD4⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Zellsuspensionen dieser Tiere, sowie naiver Tiere wurden durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden die Effektor CD4⁺ T-Zellen aus Milz (A) und Lymphknoten (B) durchflusszytometrisch auf die Expression von TNF-α analysiert und als prozentuellen Anteil TNF-α expremierender CD4⁺ T-Zellen an der gesamten Effektor CD4⁺ T-Zellpopulation angegeben. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s. = nicht signifikant.

Die beobachteten Auswirkungen der Treg Depletion auf die Expression der Zytokine IFN-γ, IL-2 und TNF-α, lassen den Schluss zu, dass die Effektorfunktion der CD4⁺ T-Zellen auch während der chronischen Infektion durch Tregs supprimiert wird.

4.6.6 Analyse der Zytotoxizität der Effektor CD4⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion

Frühere Arbeiten lassen vermuten, dass zytotoxische T-Zellen die Viruslast in der chronischen Infektion kontrollieren. Daher wurde die Expression des zytotoxischen Moleküls GzmB in Effektor CD4⁺ T-Zellen in der chronischen Infektion und nach Depletion von Tregs analysiert. Wieder zeigte sich beim Vergleich der Effektor CD4⁺ T-Zellen naiver- und chronisch infizierter Tiere, sowohl in der Milz, als auch in den Lymphknoten kein signifikanter Unterschied. Durchschnittlich 1,5% der Effektor CD4⁺ T-Zellen in den Milzen naiver Tiere expremierten GzmB (Abbildung 4.25A). In den

Milzen der chronisch infizierten Tiere exprimierten durchschnittlich 1,3% der Effektor $CD4^+$ T-Zellen $TNF-\alpha$. Durch die Behandlung mit DT kam es zu einer signifikanten Steigerung auf durchschnittlich 6,1% in den Milzen. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Effektor $CD4^+$ T-Zellen der Lymphknoten gemacht, wo nach Depletion der Tregs die Expression signifikant auf durchschnittlich 17,5% anstieg.

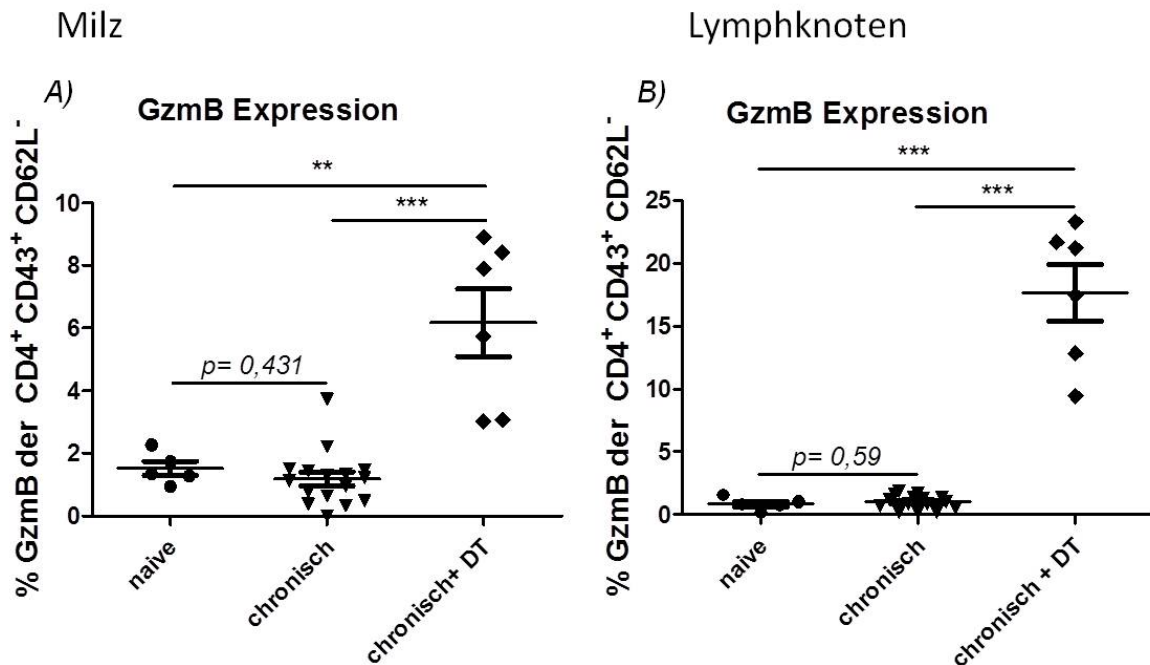


Abbildung 4.25 Einfluss von Tregs auf die GzmB Expression durch $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion.

Mit FV-infizierte Tiere wurden 60 Tage nach FV-Infektion getötet und Zellsuspensionen dieser Tiere, sowie naive Tiere wurden durchflusszytometrisch analysiert. Es wurden die Effektor $CD4^+$ T-Zellen aus Milz (A) und Lymphknoten (B) durchflusszytometrisch auf die Expression von GzmB analysiert und als prozentuellen Anteil GzmB exprimierender $CD4^+$ T-Zellen an der gesamten Effektor $CD4^+$ T-Zellpopulation angegeben. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Der Mittelwert für jede Gruppe ist durch einen Balken dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des „Student t Test“ analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind dargestellt durch * < 0,05; ** < 0,005; *** < 0,0005, n.s.= nicht signifikant.

5 Diskussion

Die Immunantwort auf eine Infektion erfordert ein perfekt abgestimmtes Zusammenspiel zahlreicher Komponenten des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Eine wichtige Komponente, die $CD4^+$ T-Zellantwort, wurde lange Zeit auf die immunstimulierende Funktion der Helferzellen reduziert. Tatsächlich sind $CD4^+$ T-Zellen in vielen viralen Infektionen essentiell, um die Antikörperproduktion durch B-Zellen zu fördern und um die Bildung zytotoxischer und Gedächtnis $CD8^+$ T-Zellen zu unterstützen (103). Am deutlichsten wird dies in der HIV Infektion. Da hier $CD4^+$ T-Zellen das Hauptangriffsziel des Virus darstellen, kann mit fortschreitender Abnahme der $CD4^+$ T-Zellzahlen eine Korrelation mit der verminderten zytotoxischen Funktion der $CD8^+$ T-Zellen (6) und der Verminderung der Produktion neutralisierender Antikörper beobachtet werden (97). Diese Entwicklung ist verantwortlich für die Progression zu AIDS. In der HIV Infektion sind $CD4^+$ T-Zellen nicht essentiell, um die primäre $CD8^+$ T-Zellantwort zu induzieren. Fehlt den $CD8^+$ T-Zellen jedoch die Hilfe der $CD4^+$ T-Zellen am Ende der primären Antwort, so entwickelt sich eine weniger effektive und deutlich kleinere Population von $CD8^+$ Gedächtniszellen und die Antwort auf eine Restimulation fällt sehr viel schwächer aus (52). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Expansion HIV spezifischer $CD4^+$ T-Zellen zu Beginn der Infektion über den Verlauf der Infektion entscheidet. So scheint eine Expansion der $CD4^+$ T-Zellpopulation, nicht aber der $CD8^+$ T-Zellpopulation mit der spontanen Kontrolle der Infektion zu korrelieren (95). Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die die Rolle der $CD4^+$ T-Zellen in der akuten FV Infektion mittels Depletion dieser Population bestimmten, zeigten, dass $CD4^+$ T-Zellen in der frühen Phase der FV Infektion keine wichtige Rolle spielen und in der akuten Phase vorwiegend Helferfunktionen übernehmen (72). Weder Viruslast noch die Funktion der $CD8^+$ T-Zellen nach Depletion war verändert oder beeinträchtigt (113). Im Gegensatz zur initialen Phase der akuten Infektion, konnte für die späte Phase gezeigt werden, dass eine Depletion der $CD4^+$ T-Zellen zu einer verminderten Antikörper-, sowie einer verminderten $CD8^+$ T-Zellantwort führt, was die Bedeutung der Helferfunktion der $CD4^+$ T-Zellen in der FV-Infektion unterstreicht (72). Nach heutigem Wissensstand müssen diese Ergebnisse jedoch neu bewertet werden, da die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen mittels monoklonaler Antikörper auch die gesamte $CD4^+$ Foxp3⁺ Treg Population depletiert. Die Ergebnisse zeigen also

gleichzeitig die Effekte der Depletion von $CD4^+$ Helfer T-Zellen, sowie Tregs, was eine Interpretation erschwert. Daher wurde in dieser Arbeit eine phänotypische und funktionelle Analyse der $CD4^+$ T-Zellen während der FV-Infektion vorgenommen.

Es konnte gezeigt werden, dass FV spezifische $CD4^+$ T-Zellen, sowie $CD4^+$ Effektor T-Zellen einer sehr ähnlichen FV induzierten Kinetik folgen, wie auch $CD8^+$ T-Zellen nach FV Infektion. 8 Tage nach Infektion kam es zu einer Verdopplung der Anzahl mitotischer $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 4.1). Die Infektion führt also zu einer signifikanten Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen. Zudem erhöhte sich sowohl die Anzahl FV spezifischer Tet II^+ $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 4.2), als auch deren funktionelles Potential. So produzierten Effektor $CD4^+$ T-Zellen an Tag 10 nach Infektion die Zytokine IFN- γ und IL-2 (Abbildung 4.6).

Abhängig von dem präsentierten Antigen, der Art der antigenpräsentierenden Zelle, der Dauer des Kontaktes bei der Antigenpräsentation, sowie des umgebenden Zytokinmilieus, differenzieren $CD4^+$ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen. Im Falle von Virusinfektionen differenzieren $CD4^+$ T-Zellen in den meisten Fällen zu Th1- Zellen. Dieser Subtyp expremiert die „Signaturzytokine“, IFN- γ , IL-2 und TNF- α . In verschiedenen Infektionsmodellen konnte gezeigt werden, dass Th1-Zellen neben der klassischen Helferfunktion auch direkte antivirale Funktionen, z.B. in LCMV-(105), HSV-(64), Vaccinia Virus-(63), Masern- (84) und der Friend Infektion (48) erfüllen. In jüngster Zeit wurden vermehrt Ergebnisse publiziert, die die Einführung einer weiteren CD4 Subpopulation nahelegen. In zahlreichen Infektionsmodellen konnte gezeigt werden, dass $CD4^+$ T-Zellen neben ihrer Helferfunktion und der Sekretion antiviraler Faktoren auch eine direkte antivirale Funktion haben, die durch die Lyse der Virus-infizierten Zellen vermittelt wird. In vivo konnte diese zytotoxische Funktion der $CD4^+$ T-Zellen für LCMV (53) und Influenza (15) und in vitro für HIV-1 (74), Influenza (49), EBV und CMV (9) gezeigt werden.

Weitgehend unbekannt sind die Mechanismen mit denen zytotoxische $CD4^+$ T-Zellen viriusinfizierte Zellen töten. In Bezug auf das FV konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass $CD4^+$ T-Zellen das zytotoxische Molekül GzmB expremieren (Abbildung 4.13). Dies hatte jedoch keine Auswirkung auf die in vivo Zytotoxizität. So konnte keine $CD4^+$ T-Zell vermittelte Tötung von Zielzellen im in vivo CTL Assay nachgewiesen werden.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, welchen Stellenwert $CD4^+$ T-Zellen bezüglich der direkten antiviralen Immunität einnehmen können, wenn sie ausschließlich Antigene

erkennen, die in Zusammenhang mit MHC-II Komplexen präsentiert werden. Aus diesem Grund ist auch die Beteiligung von zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen an der Viruselimination während der akuten Infektion fraglich, da hier bevorzugt Ter119⁺ erythroide Vorläuferzellen durch das FV infiziert werden, welche keine MHC-II Komplexe exprimieren. In der Tumorummunologie haben jüngste Forschungen gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen auch dann zytotoxische Funktionen ausüben, wenn die Tumorzellen keine MHC-II Moleküle exprimieren (4). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass CD4⁺ T-Zellen einerseits Antigen präsentierende Zellen rekrutieren oder andererseits auch Stromazellen abtöten, welche das Tumorstadium begünstigen. In der chronischen Phase der Infektion, wenn die Viren nicht mehr vornehmlich erythroide Vorläuferzellen, sondern B-Zellen infizieren, können CD4⁺ T-Zellen eine direkte, MHC-II vermittelte, antivirale Funktion ausüben (42). In der vorliegenden Arbeit wurde eine phänotypische und funktionelle Analyse der CD4⁺ T-Zellen sowohl in der akuten, als auch in der chronischen Phase der FV Infektion vorgenommen. In beiden Fällen konnte nur ein sehr geringes zytotoxisches Potential beobachtet werden. Dies bestätigt frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, dass CD4⁺ T-Zellen keine direkte antivirale Funktion haben (26, 113). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die starke antivirale Aktivität der CD8⁺ T-Zellen während der akuten Infektionsphase, welche die zytotoxische Funktion von CD4⁺ T-Zellen überflüssig machen könnte. Um diese These zu untersuchen, wurden CD8⁺ T-Zellen in der akuten Phase der FV Infektion depletiert und die Auswirkungen auf die CD4⁺ T-Zellantwort untersucht. Die Ergebnisse zeigten keinen Effekt auf die CD4⁺ T-Zellantwort (Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10) und legen nahe, dass CD8⁺ T-Zellen nicht, oder nicht allein für das Ausbleiben der zytotoxischen CD4⁺ T-Zellantwort verantwortlich sind.

Weitere Publikationen dieser Arbeitsgruppe legen nahe, dass das Ausbleiben der zytotoxischen CD4⁺ T-Zellantwort auf die supprimierende Wirkung der Tregs zurückzuführen ist. Tregs expandieren ab Tag 10 der akuten FV Infektion (116). Die Funktion von Tregs für die Immunantwort gegen eine Infektion oder einen Tumor hat grundsätzlich zwei Aspekte. Einerseits verhindert die immunsupprimierende Wirkung der Tregs eine Immunpathologie, andererseits kann die Suppression der Immunantwort zu der Etablierung einer chronischen Infektion durch Immunevasion führen (106). Die temporäre Depletion von Tregs während der akuten FV Infektion führte hier allerdings nicht zu histologisch nachweisbaren Immunpathologien und

auch nicht zu einer kompletten Eliminierung des Virus (115). Grundsätzlich scheint sich sogar die Wirkung von Tregs auf die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems bei verschiedenen Infektionen zu unterscheiden. Einerseits führte die Depletion von Tregs in der HSV-2 Infektion bei Mäusen zu einer gesteigerten Viruslast (61), andererseits führte das gleiche Verfahren in der FV-Infektion zu einer verminderten Viruslast (115). Beide Infektionsmodelle unterscheiden sich stark anhand der Beteiligung der einzelnen Komponenten des Immunsystems. Während die HSV-2 Infektion besonders von den Komponenten des angeborenen Immunsystems kontrolliert wird, ist bei der FV-Infektion vorwiegend das adaptive Immunsystem an der Kontrolle beteiligt. Zudem unterscheiden sich beide Modelle im Ort der Virusreplikation. Während das FV in lymphoiden Geweben repliziert, infiziert HSV-2 vornehmlich Epithelzellen und persistiert in den sakralen Ganglien. Aufgrund dieser Unterschiede ist ein direkter Vergleich der beiden Infektionsmodelle schwer möglich. Offensichtlich beeinflussen diese Unterschiede jedoch die Wirkung der Tregs auf die Zellen des Immunsystems und somit den Ausgang der Infektion. Für die FV Infektion konnte gezeigt werden, dass Tregs für die Etablierung der chronischen Infektion durch Suppression der CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind. Auch in der HIV Infektion üben Tregs eine supprimierende Wirkung auf das zytotoxische Potential virusspezifischer Zellen aus. So konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Tregs in Patienten mit erfolgreicher HAART-Therapie oder solchen, die die Kontrolle des Virus lange Zeit ganz ohne Therapie erreichen, im Vergleich zu jenen, die unbehandelt sind oder auf die HAART-Therapie nicht ansprechen, deutlich verringert ist (92). In Bezug auf die Suppression der CD4⁺ T-Zellantwort in der FV Infektion wurde gezeigt, dass TCR transgene CD4⁺ T-Zellen besonders dann IFN- γ produzieren, wenn in den FV infizierten Empfängermäusen Tregs depletiert worden waren. Andernfalls ließ ihre antivirale Wirkung nach Zelltransfer nach, was auf die Wirkung der Tregs zurück geführt wird (72). Die supprimierende Wirkung der Tregs auf CD4⁺ T-Zellen konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Treg Depletion in der akuten Phase der FV Infektion führte zu einem Funktionsgewinn von endogenen CD4⁺ T-Zellen. So erhöhte sich die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-4 (Abbildung 4.12), sowie des zytotoxischen Moleküls GzmB und im in vivo CD4⁺ CTL-Assay (Abbildung 4.13) zeigte sie zum ersten Mal eine zytotoxische Funktion knapp oberhalb des Detektionslimits. Außerdem konnte eine Verringerung der Viruslast beobachtet werden, was aber größtenteils auf die nun nicht mehr suppressierte

Funktion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist. Die genauen Mechanismen, anhand derer Tregs ihre supprimierende Wirkung entfalten, sind seit längerem Gegenstand intensiver Forschung. Derzeit werden verschiedene Mechanismen diskutiert, anhand derer Tregs ihre supprimierende Funktion vermitteln könnten. Da die Expansion der Tregs mit der Kontraktion der Effektorzellpopulation zeitlich korreliert, ist die direkte Abtötung der Effektorzellen durch die Tregs ein denkbarer Mechanismus. In der Tat konnte bereits gezeigt werden, dass Tregs die Gzm/Perforin vermittelte Apoptoseinduktion verwenden, um andere T-Zellen abzutöten (101). Dieser Mechanismus wurde aber zumindest für das FV Infektionsmodell ausgeschlossen, da hier in der akuten Infektion keine GzmB exprimierenden Tregs detektiert werden konnten (115). Außerdem konnte gezeigt werden, dass immunsupprimierende Zytokine wie IL-10 und TGF- β keine Rolle bei der supprimierenden Wirkung der Tregs in der FV-Infektion spielen. Für HIV und SIV Infektionen konnte histologisch belegt werden, dass sich Tregs häufig in unmittelbarer Nähe zu ihren Zielzellen befinden (31, 69), was einen kontaktabhängigen Mechanismus nahelegt. Denkbar ist hier, dass das kostimulatorische Signal für T-Zellen unterbunden wird, indem Tregs, mit ihrem CTLA-4 Rezeptor, die entsprechenden CD8 Liganden CD80 und CD86 abfangen. T-Zellen sind somit weniger gut aktivierbar. Weiterhin wird eine Beteiligung von cAMP diskutiert. Von Tregs synthetisiertes cAMP kann einerseits die CTLA-4 Expression erhöhen und somit den zuvor genannten Effekt verstärken, andererseits kann der Transfer von cAMP über gap Junctions den Metabolismus und somit die Funktionalität der Effektor T-Zellen stören (69). Alle genannten Mechanismen werden kontaktabhängig vermittelt, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen eines in vitro Suppressions-Tests aus dem FV Infektionsmodell ist (86). Der genaue Mechanismus zur Vermittlung der supprimierenden Funktion der Tregs auf CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellen in der FV Infektion ist allerdings weiter ungeklärt.

Die Depletion von CD8⁺ T-Zellen hatte also im Gegensatz zur Depletion der Tregs keinen Effekt auf das funktionelle Potential der Effektor CD4⁺ T-Zellen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in einem Tumormodell für die Eliminierung der Tumorzellen erzielt. Hier konnte gezeigt werden, dass die alleinige CD8⁺ T-Zelldepletion zu einem Kontrollverlust über das Tumorwachstum führt. Die zusätzliche Depletion von Tregs hatte den Effekt, dass zytotoxische CD4⁺ T-Zellen die Kontrolle über das Tumorwachstum übernehmen und den Tumor sogar

vollständig eliminieren können (4). Es stellte sich somit die Frage, ob $CD4^+$ T-Zellen im FV Modell an funktionellem Potential gewinnen können, wenn sowohl $CD8^+$ T-Zellen als auch Tregs depletiert werden. Die Depletion von $CD8^+$ T-Zellen und Tregs mag zunächst als ein artifizieller Ansatz erscheinen, doch kommt sie der Situation der chronischen FV Infektion nahe, in der $CD8^+$ T-Zellen funktionell erschöpft sind (117). Dieser Funktionsverlust von $CD8^+$ T-Zellen in chronischen Infektionen wurde auch für HIV (8) und HCV (40) beschrieben. Hier wird der Funktionsverlust ebenfalls mit der supprimierenden Wirkung von Tregs begründet (1, 2). Die Depletion von Tregs und $CD8^+$ T-Zellen in der akuten FV Infektion hatte eine drastische Expansion der Effektor $CD4^+$ T-Zellen zur Folge (Abbildung 4.11). Diese expandierten Zellen exprimierten deutlich mehr Zytokine (Abbildung 4.12) und das zytotoxische Molekül GzmB. Zudem konnte das im Vergleich zur alleinigen Depletion von Tregs oder $CD8^+$ T-Zellen signifikant gesteigerte zytotoxische Potential in vivo mit dem CTL Test belegt werden (Abbildung 4.13). Die Untersuchung der Viruslast zeigte eine Verminderung im Vergleich zur alleinigen $CD8^+$ T-Zelldepletion. Diese Befunde zeigen, dass FV spezifische $CD4^+$ Effektor T-Zellen zwar an funktionellem Potential gewinnen, wenn die supprimierende Wirkung der Tregs entfällt, sie aber weiterhin durch die Anwesenheit von $CD8^+$ T-Zellen in ihrem zytotoxischen Potential gehemmt werden. Dies wird deutlich durch die zusätzliche Steigerung der zytotoxischen Wirkung der Effektor $CD4^+$ T-Zellen in doppelt depletierten Tieren. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei $CD8$ depletierten SIV infizierten Makaken gemacht. Auch hier expandierte die GzmB exprimierende $CD4^+$ T-Zellpopulation nach $CD8^+$ T-Zelldepletion (108).

Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, dass Effektor $CD4^+$ T-Zellen besonders nach Depletion von $CD8^+$ T-Zellen und Tregs an Zytotoxizität gewinnen, ist die Beteiligung von $CD8^+$ Tregs an der Suppression der $CD4^+$ T-Zellen. Dieser relativ neu beschriebenen Population konnten in Krebspatienten, sowie in Patienten mit Autoimmunerkrankungen supprimierende Eigenschaften zugeschrieben werden (60). Eine andere mögliche Erklärung ist die Beteiligung des Transkriptionsfaktors Eomesodermin. In vitro konnte gezeigt werden, dass dieser Transkriptionsfaktor die Polarisierung naiver T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen induziert (30). Eomes selber wird u. A. durch Ligandenbindung der co-stimulierenden Rezeptoren CD134 (OX40) und CD137 (4-1BB) induziert (82). Diese Rezeptoren werden von allen T-Zellen exprimiert, jedoch in deutlich höherem Maße von $CD8^+$ T-Zellen, als von $CD4^+$ T-

Zellen (94). Bei der Ligandenbindung könnte es also zu einer Konkurrenz der beiden Zellpopulationen kommen, wobei die $CD8^+$ T-Zellen aufgrund der höheren Rezeptordichte im Vorteil sind und somit den Großteil der Liganden konsumieren. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit *in vivo* mittels agonistischer Stimulation mit einem anti-CD137 Antikörpers bestätigt werden. Bereits die Injektion des Antikörpers in akut FV infizierte Mäuse führte sowohl zu einer signifikanten Expansion FV spezifischer Effektor $CD4^+$ T-Zellen (Abbildung 4.14), wie auch einer signifikanten Zunahme der Funktionalität in Bezug auf die Zytotoxizität (Abbildung 4.16) dieser Zellen. Die zusätzliche Depletion der $CD8^+$ T-Zellen verstärkte diesen Effekt, da dadurch alle Antikörper den $CD4^+$ T-Zellen zur Verfügung standen. Diese Ergebnisse bestätigen die wichtige Rolle Co-stimulierender Rezeptoren bei der Induktion einer zytotoxischen $CD4^+$ T-Zellantwort und untermauern die These der Konkurrenz zwischen $CD4^+$ - und $CD8^+$ T-Zellen um stimulierende Ligandenbindungen. Die Anwendbarkeit von anti-CD137 Antikörpern für die Stimulation der Zytotoxizität von Effektorzellen in der Therapie chronischer Infektionen wurde kürzlich im FV Infektionsmodell untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass der Transfer von FV spezifischen $CD8^+$ T-Zellen, die zuvor mit anti-CD137 stimuliert wurden, in chronisch infizierten Mäusen, zu einer beinahe 99% Reduktion der Viruslast führt (87). Außerdem konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt nicht auf einer Verminderung der suppressiven Eigenschaften der Tregs, sondern vielmehr einer verminderten Supprimierbarkeit der $CD8^+$ T-Zellen durch Tregs zurückzuführen ist (87). Eine mögliche Strategie zur Verbesserung der Immunkompetenz bei viralen Erkrankungen wäre somit der Einsatz dieser Antikörper zur Induktion einer zytotoxischen $CD4^+$ T-Zellantwort.

Die chronische Infektion ist gekennzeichnet durch eine niedrige, aber persistierende Viruslast und einen gleichzeitigen Funktionsverlust der $CD8^+$ T-Zellen. Dieser Funktionsverlust ist einerseits auf die supprimierende Wirkung der expandierten Treg Population zurückzuführen (24) und andererseits auf die Erschöpfung der $CD8^+$ T-Zellen. Diese Erschöpfung wird durch die Expression inhibitorischer Rezeptoren, wie z.B. PD-1 und Lag3, auf $CD8^+$ T-Zellen hervorgerufen, welche wiederum durch die chronische Antigenstimulation induziert werden (110). Der letzte Mechanismus konnte bereits für LCMV (110) gezeigt werden und auch für das FV Modell wird die Beteiligung eines ähnlichen Mechanismus vermutet (117). Da in der chronischen FV Infektion die zytotoxische Wirkung der $CD8^+$ T-Zellen also weitestgehend entfällt,

stellt sich die Frage, welche Zellpopulation die chronische Infektion kontrolliert. Wie bereits erwähnt, sind es in der chronischen Infektion nicht länger erythroide Vorläuferzellen, welche das Virusreservoir darstellen, sondern vornehmlich B-Zellen (42). Diese exprimieren MHC-II Moleküle, was sie für die zytotoxische Wirkung von $CD4^+$ T-Zellen angreifbar macht. Zudem zeigte sich in vorangegangenen Arbeiten, dass die Depletion von $CD4^+$ T-Zellen während der chronischen Phase der FV Infektion zu einem deutlichen Anstieg der Viruslast führte, während die Depletion von $CD8^+$ T-Zellen keinen Effekt hatte (42). Hinzu kommt, dass in chronischen Infektionen, wie CMV, HIV und EBV beobachtet wurde, dass eine wichtige virale Strategie der Immunevasion darin besteht, die MHC-I Expression zu minimieren (5). Möglicherweise führt dies zu einer vermehrten Beanspruchung des MHC-II Wegs. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch die chronische Phase der FV Infektion in Bezug auf das antivirale Potential von $CD4^+$ T-Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass im Vergleich zum naiven Tier mehr FV spezifische- und Effektor $CD4^+$ T-Zellen vorhanden waren (Abbildung 4.19). Da $CD8^+$ T-Zellen in der chronischen Infektion keine zytotoxische Funktion ausüben, konnte davon ausgegangen werden, dass keine konkurrierende Situation um aktivierende Signale zwischen $CD8^+$ - und $CD4^+$ T-Zellen besteht, wie es zuvor für die akute FV Infektion belegt wurde. Daher wurde in dieser Arbeit ausschließlich die Treg Zellpopulation depletiert um zu überprüfen, ob sich das funktionelle Potential der $CD4^+$ Effektor T-Zellen hierdurch verbessern lässt. In der Tat führte die Depletion von Tregs in der chronischen Infektion zu einer signifikanten Expansion von FV spezifischen Effektor $CD4^+$ T-Zellen. Diese exprimierten signifikant mehr Zytokine sowie das zytotoxische Molekül GzmB (Abbildung 4.25). Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben jedoch gezeigt, dass die chronische FV-Infektion besonders über den Fas/Fas-L Signalweg kontrolliert wird und nicht Gzm vermittelt ist (112). Diese Erkenntnisse wurden mit Fas Knockoutmäusen erzielt, in denen eine zusätzliche Depletion der Tregs nicht möglich ist. Die durchflusszytometrische Messung der Fas Expression bedarf einer zusätzlichen ex vivo Restimulation der Zellsuspensionen und liefert somit artifizielle Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Analyse der Fas Expression verzichtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen eine potenzielle Zytotoxizität besitzen, die unter physiologischen Bedingungen von $CD8^+$ T-Zellen und Tregs supprimiert wird. Die Induktion dieses Potentials z.B. durch aktivierende

Ligandenstimulation oder der Manipulation der supprimierenden Tregs stellen eine neue Möglichkeit dar, die Therapie chronischer Infektionen zu verbessern.

6 Zusammenfassung

CD4⁺ T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der antiviralen Immunantwort und werden über ihre Helferfunktion definiert und charakterisiert. Auch bei der FV-Infektion wurde gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen in der akuten Infektion expandieren. In der letzten Zeit wurden zunehmend Ergebnisse publiziert, die belegen, dass diese Zellen auch eine zytotoxische Funktion erfüllen können. Die Frage, ob CD4⁺ T-Zellen ein zytotoxisches Potential im FV Model besitzen und wie diese Funktion von anderen Zellen des Immunsystems reguliert wird, ist von großer Bedeutung. Dies gilt besonders deshalb, weil zunehmend klar wird, dass die Population der antigen-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen bei vielen chronischen Infektionen ihre Funktionalität verliert und somit andere Zellen ihre Funktion übernehmen müssen.

Anhand der Tetramer Technologie war es möglich FV spezifische CD4⁺ T-Zellen nach FV Infektion zu detektieren und diese für die nachfolgende funktionelle Analyse weiter zu charakterisieren. Während der akuten Infektion expandieren CD4⁺ T-Zellen und produzieren proinflammatorische Zytokine, wie IFN- γ oder IL-2. Nur wenige CD4⁺ T-Zellen produzierten das zytotoxische Molekül Granzym B. Um die hemmende Wirkung von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen (Tregs) und CD8⁺ Effektorzellen auf Differenzierung und Funktionalität von zytotoxischen CD4⁺ T-Zellen zu definieren, wurden diese Zellpopulationen depletiert. Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von Tregs der Anteil FV spezifischer CD4⁺-und Effektor CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöht war. Außerdem produzierten die CD4⁺ T-Zellen deutlich mehr Effektorzytokine. Die alleinige Depletion der CD8⁺ T-Zellen hatte in der akuten FV Infektion keinen positiven Effekt auf die Funktionalität der CD4⁺ T-Zellen. Die kombinierte Depletion von Tregs und CD8⁺ T-Zellen hatte hingegen besonders in Bezug auf die Expression von GzmB und die Zytotoxizität von CD4⁺ T-Zellen einen fördernden Einfluss. Die Zytotoxizität konnte durch ko-stimulatorische Rezeptoren (CD137) verstärkt werden, was vor allem in Abwesenheit von CD8⁺ T-Zellen deutlich wurde.

In der chronischen Infektion, welche sich durch eine konstant niedrige Viruslast und eine dysfunktionale CD8⁺ T-Zellpopulation auszeichnet, konnte nur eine geringe Funktionalität von CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Die Depletion von Tregs führte zu einer deutlichen Steigerung dieser Funktionalität. So konnte die Effektorfunktion,

gemessen anhand der Zytokinexpression, sowie der Produktion von zytotoxischen Molekülen deutlich gesteigert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das zytotoxische Potential von Effektor CD4⁺ T-Zellen in der FV Infektion von CD8⁺ T-Zellen und Tregs beeinflusst wird. Die Induktion von zytotoxischen CD4⁺ Effektorzellen könnte einen erfolgversprechenden Ansatz für die zukünftiger Therapie chronischer Viruserkrankungen darstellen.

Summary

CD4⁺ T-cells are an integral part of the antiviral immune response and are defined and characterized by their helper function. As in other infection models, it was shown for the FV-Infection that CD4⁺ T-cells expand during the acute phase of infection. An increasing amount of recent publications shows that these cells have an additional cytotoxic function. The question if CD4⁺ T-cells indeed have a cytotoxic function in the FV-infection and how this function is controlled by other cells of the immune system is of major importance. Especially because it becomes more and more clear that cytotoxic CD8⁺ T-cells lose functionality during the chronic phase of infection and therefore other cells need to take over this function.

By using the tetramer technology it was possible to detect FV specific CD4⁺ T-cells and to characterize them for the following analysis. CD4⁺ T-cells expand during the acute phase of infection and produce proinflammatory cytokines like IFN- γ or IL-2. Only few CD4⁺ T-cells produced the cytotoxic molecule Granzym B. To define the inhibitory function of Tregs and CD8⁺ T-cells on the differentiation and functionality of cytotoxic CD4⁺ T-cells, these cell populations were depleted. In the absence of Tregs the amount of FV-specific- and effector CD4⁺ T-cells increased significantly. In addition the amount of cytokines produced by CD4⁺ T-cells was increased. Single depletion of CD8⁺ T-cells did not have any positive effect on the functionality of CD4⁺ T-cells. In contrast double depletion of Tregs and CD8⁺ T-cells did have a positive effect on the functionality of CD4⁺ T-cells, particularly on the expression of GzmB and cytotoxicity. Beyond that, the cytotoxicity was increased by co-stimulatory receptors (CD137) especially in the absence of CD8⁺ T-cells.

In the chronic Infection, which is characterized by a constantly low level of virus load and a dysfunctional CD8⁺ T-cell population, only low functional CD4⁺ T-cells were observed. Depletion of Tregs clearly increased the functionality of CD4⁺ T-cells. The effector function characterized by the expression of cytokines as well as the production of cytotoxic molecules was increased considerably.

These results show that the cytotoxic potential of effector CD4⁺ T-cells in the FV-infection is affected by Tregs and CD8⁺ T-cells. The induction of cytotoxic effector CD4⁺ T-cells might be a promising strategy for the therapy of chronic viral infections.

7 Literaturverzeichnis

1. **Aandahl, E. M., J. Michaelsson, W. J. Moretto, F. M. Hecht, and D. F. Nixon.** 2004. *Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens.* *J Virol* **78**:2454-2459.
2. **Accapezzato, D., V. Francavilla, M. Paroli, M. Casciaro, L. V. Chircu, A. Cividini, S. Abrignani, M. U. Mondelli, and V. Barnaba.** 2004. *Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection.* *J Clin Invest* **113**:963-972.
3. **Aderem, A., and D. M. Underhill.** 1999. *Mechanisms of phagocytosis in macrophages.* *Annu Rev Immunol* **17**:593-623.
4. **Akhmetzyanova, I., G. Zelinskyy, S. Schimmer, S. Brandau, P. Altenhoff, T. Sparwasser, and U. Dittmer.** 2013. *Tumor-specific CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eliminate virus-induced tumor cells in the absence of regulatory T cells.* *Cancer immunology, immunotherapy : CII* **62**:257-271.
5. **Alcami, A., and U. H. Koszinowski.** 2000. *Viral mechanisms of immune evasion.* *Immunology today* **21**:447-455.
6. **Altfeld, M., and E. S. Rosenberg.** 2000. *The role of CD4(+) T helper cells in the cytotoxic T lymphocyte response to HIV-1.* *Curr Opin Immunol* **12**:375-380.
7. **Antunes, I., M. Tolaini, A. Kissenpfennig, M. Iwashiro, K. Kuribayashi, B. Malissen, K. Hasenkrug, and G. Kassiotis.** 2008. *Retrovirus-specificity of regulatory T cells is neither present nor required in preventing retrovirus-induced bone marrow immune pathology.* *Immunity* **29**:782-794.
8. **Appay, V., D. F. Nixon, S. M. Donahoe, G. M. Gillespie, T. Dong, A. King, G. S. Ogg, H. M. Spiegel, C. Conlon, C. A. Spina, D. V. Havlir, D. D. Richman, A. Waters, P. Easterbrook, A. J. McMichael, and S. L. Rowland-Jones.** 2000. *HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function.* *J Exp Med* **192**:63-75.
9. **Appay, V., J. J. Zaunders, L. Papagno, J. Sutton, A. Jaramillo, A. Waters, P. Easterbrook, P. Grey, D. Smith, A. J. McMichael, D. A. Cooper, S. L. Rowland-Jones, and A. D. Kelleher.** 2002. *Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo.* *J Immunol* **168**:5954-5958.
10. **Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi.** 1996. *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.* *J Exp Med* **184**:387-396.
11. **Balkow, S., F. Krux, K. Loser, J. U. Becker, S. Grabbe, and U. Dittmer.** 2007. *Friend retrovirus infection of myeloid dendritic cells impairs maturation, prolongs contact to naive T cells, and favors expansion of regulatory T cells.* *Blood* **110**:3949-3958.
12. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).* *Science* **220**:868-871.
13. **Beutler, B.** 2003. *Innate immune responses to microbial poisons: discovery and function of the Toll-like receptors.* *Annual review of pharmacology and toxicology* **43**:609-628.

14. **Beutler, B.** 2004. *Innate immunity: an overview.* *Mol Immunol* **40**:845-859.
15. **Brown, D. M., A. M. Dilzer, D. L. Meents, and S. L. Swain.** 2006. *CD4 T cell-mediated protection from lethal influenza: perforin and antibody-mediated mechanisms give a one-two punch.* *J Immunol* **177**:2888-2898.
16. **Brun-Vezinet, F., C. Rouzioux, L. Montagnier, S. Chamaret, J. Gruest, F. Barre-Sinoussi, D. Geroldi, J. C. Chermann, J. McCormick, S. Mitchell, and et al.** 1984. *Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS.* *Science* **226**:453-456.
17. **Bukowski, J. F., J. F. Warner, G. Dennert, and R. M. Welsh.** 1985. *Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo.* *J Exp Med* **161**:40-52.
18. **Che, K. F., R. L. Sabado, E. M. Shankar, V. Tjomsland, D. Messmer, N. Bhardwaj, J. D. Lifson, and M. Larsson.** 2010. *HIV-1 impairs in vitro priming of naive T cells and gives rise to contact-dependent suppressor T cells.* *Eur J Immunol* **40**:2248-2258.
19. **Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1986. *Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2.* *Nature* **324**:691-695.
20. **Cobbold, S. P., S. X. Qin, and H. Waldmann.** 1990. *Reprogramming the immune system for tolerance with monoclonal antibodies.* *Semin Immunol* **2**:377-387.
21. **Collins, J. K., W. J. Britt, and B. Chesebro.** 1980. *Cytotoxic T lymphocyte recognition of gp70 on Friend virus-induced erythroleukemia cell clones.* *J Immunol* **125**:1318-1324.
22. **D'Andrea, A. D.** 1992. *The interaction of the erythropoietin receptor and gp55.* *Cancer Surv* **15**:19-36.
23. **DeLarco, J., and G. J. Todaro.** 1976. *Membrane receptors for murine leukemia viruses: characterization using the purified viral envelope glycoprotein, gp71.* *Cell* **8**:365-371.
24. **Dietze, K. K., G. Zelinskyy, K. Gibbert, S. Schimmer, S. Francois, L. Myers, T. Sparwasser, K. J. Hasenkrug, and U. Dittmer.** 2011. *Transient depletion of regulatory T cells in transgenic mice reactivates virus-specific CD8+ T cells and reduces chronic retroviral set points.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:2420-2425.
25. **Dittmer, U., and K. J. Hasenkrug.** 2001. *Cellular and molecular mechanisms of vaccine-induced protection against retroviral infections.* *Curr Mol Med* **1**:431-436.
26. **Dittmer, U., H. He, R. J. Messer, S. Schimmer, A. R. Olbrich, C. Ohlen, P. D. Greenberg, I. M. Stromnes, M. Iwashiro, S. Sakaguchi, L. H. Evans, K. E. Peterson, G. Yang, and K. J. Hasenkrug.** 2004. *Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection.* *Immunity* **20**:293-303.
27. **Dittmer, U., B. Race, and K. J. Hasenkrug.** 1999. *Kinetics of the development of protective immunity in mice vaccinated with a live attenuated retrovirus.* *J Virol* **73**:8435-8440.
28. **Dittmer, U., B. Race, K. E. Peterson, I. M. Stromnes, R. J. Messer, and K. J. Hasenkrug.** 2002. *Essential roles for CD8+ T cells and gamma interferon in protection of mice against retrovirus-induced immunosuppression.* *J Virol* **76**:450-454.

29. **Eisenbarth, G. S., and B. L. Kotzin.** 2003. Enumerating autoreactive T cells in peripheral blood: a big step in diabetes prediction. *J Clin Invest* **111**:179-181.
30. **Eshima, K., S. Chiba, H. Suzuki, K. Kokubo, H. Kobayashi, M. Iizuka, K. Iwabuchi, and N. Shinohara.** 2012. Ectopic expression of a T-box transcription factor, eomesodermin, renders CD4(+) Th cells cytotoxic by activating both perforin- and FasL-pathways. *Immunol Lett* **144**:7-15.
31. **Estes, J. D., Q. Li, M. R. Reynolds, S. Wietgreffe, L. Duan, T. Schacker, L. J. Picker, D. I. Watkins, J. D. Lifson, C. Reilly, J. Carlis, and A. T. Haase.** 2006. Premature induction of an immunosuppressive regulatory T cell response during acute simian immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* **193**:703-712.
32. **Figdor, C. G., Y. van Kooyk, and G. J. Adema.** 2002. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* **2**:77-84.
33. **Frank, M. M., and L. F. Fries.** 1991. The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology today* **12**:322-326.
34. **Friend, C.** 1957. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. *J Exp Med* **105**:307-318.
35. **Fruh, K., and Y. Yang.** 1999. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol* **11**:76-81.
36. **Gallo, R. C.** 1986. HTLV: the family of human T-lymphotropic retroviruses and their role in leukemia and AIDS. *Med Oncol Tumor Pharmacother* **3**:265-267.
37. **Graf, T.** 2008. Immunology: blood lines redrawn. *Nature* **452**:702-703.
38. **Greaves, M. F., and G. Brown.** 1973. A human B lymphocyte specific antigen. *Nature: New biology* **246**:116-119.
39. **Gregory, S. H., and E. J. Wing.** 1993. IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes. *J Immunol* **151**:1401-1409.
40. **Gruener, N. H., F. Lechner, M. C. Jung, H. Diepolder, T. Gerlach, G. Lauer, B. Walker, J. Sullivan, R. Phillips, G. R. Pape, and P. Klenerman.** 2001. Sustained dysfunction of antiviral CD8+ T lymphocytes after infection with hepatitis C virus. *J Virol* **75**:5550-5558.
41. **Hasenkrug, K. J.** 1999. Lymphocyte deficiencies increase susceptibility to friend virus-induced erythroleukemia in Fv-2 genetically resistant mice. *J Virol* **73**:6468-6473.
42. **Hasenkrug, K. J., D. M. Brooks, and U. Dittmer.** 1998. Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. *J Virol* **72**:6559-6564.
43. **Hasenkrug, K. J., and B. Chesebro.** 1997. Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:7811-7816.
44. **Hoatlin, M. E., and D. Kabat.** 1995. Host-range control of a retroviral disease: Friend erythroleukemia. *Trends Microbiol* **3**:51-57.
45. **Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi.** 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**:1057-1061.
46. **Hunter, E., and R. Swanstrom.** 1990. Retrovirus envelope glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **157**:187-253.
47. **Ishikawa, T., H. Yamada, A. Oyamada, F. Goshima, Y. Nishiyama, and Y. Yoshikai.** 2009. Protective role of Fas-FasL signaling in lethal infection with herpes simplex virus type 2 in mice. *J Virol* **83**:11777-11783.
48. **Iwashiro, M., K. Peterson, R. J. Messer, I. M. Stromnes, and K. J. Hasenkrug.** 2001. CD4(+) T cells and gamma interferon in the long-term control of persistent friend retrovirus infection. *J Virol* **75**:52-60.

49. **Jameson, J., J. Cruz, M. Terajima, and F. A. Ennis.** 1999. *Human CD8+ and CD4+ T lymphocyte memory to influenza A viruses of swine and avian species.* *J Immunol* **162**:7578-7583.
50. **Janeway.** 2002. *Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, vol. Vol. 5.*
51. **Janeway.** 2002. *Immunologie, vol. 5.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.*
52. **Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath, and S. P. Schoenberger.** 2003. *CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes.* *Nature* **421**:852-856.
53. **Jellison, E. R., S. K. Kim, and R. M. Welsh.** 2005. *Cutting edge: MHC class II-restricted killing in vivo during viral infection.* *J Immunol* **174**:614-618.
54. **Jolles, J., and P. Jolles.** 1967. *Human tear and human milk lysozymes.* *Biochemistry* **6**:411-417.
55. **Kabat, D.** 1989. *Molecular biology of Friend viral erythroleukemia.* *Curr Top Microbiol Immunol* **148**:1-42.
56. **Kolokithas, A., K. Rosenke, F. Malik, D. Hendrick, L. Swanson, M. L. Santiago, J. L. Portis, K. J. Hasenkrug, and L. H. Evans.** 2010. *The glycosylated Gag protein of a murine leukemia virus inhibits the antiretroviral function of APOBEC3.* *J Virol* **84**:10933-10936.
57. **Lahl, K., C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn, and T. Sparwasser.** 2007. *Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease.* *J Exp Med* **204**:57-63.
58. **Lander, M. R., and S. K. Chattopadhyay.** 1984. *A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses.* *J Virol* **52**:695-698.
59. **Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro.** 1984. *Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.* *Science* **225**:840-842.
60. **Lu, L., and H. Cantor.** 2008. *Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells.* *Cellular & molecular immunology* **5**:401-406.
61. **Lund, J. M., L. Hsing, T. T. Pham, and A. Y. Rudensky.** 2008. *Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells.* *Science* **320**:1220-1224.
62. **Malmgaard, L., J. Melchjorsen, A. G. Bowie, S. C. Mogensen, and S. R. Paludan.** 2004. *Viral activation of macrophages through TLR-dependent and -independent pathways.* *J Immunol* **173**:6890-6898.
63. **Maloy, K. J., C. Burkhardt, T. M. Junt, B. Odermatt, A. Oxenius, L. Piali, R. M. Zinkernagel, and H. Hengartner.** 2000. *CD4(+) T cell subsets during virus infection. Protective capacity depends on effector cytokine secretion and on migratory capability.* *J Exp Med* **191**:2159-2170.
64. **Manickan, E., R. J. Rouse, Z. Yu, W. S. Wire, and B. T. Rouse.** 1995. *Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes.* *J Immunol* **155**:259-265.
65. **Marshall, N. B., and S. L. Swain.** 2011. *Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity.* *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**:954602.
66. **Mills, K. H.** 2004. *Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?* *Nat Rev Immunol* **4**:841-855.

67. **Mittrucker, H. W., and S. H. Kaufmann.** 2004. *Mini-review: regulatory T cells and infection: suppression revisited.* *Eur J Immunol* **34**:306-312.
68. **Miyazawa, M., J. Nishio, and B. Chesebro.** 1992. *Protection against Friend retrovirus-induced leukemia by recombinant vaccinia viruses expressing the gag gene.* *J Virol* **66**:4497-4507.
69. **Moreno-Fernandez, M. E., C. M. Rueda, L. K. Rusie, and C. A. Chougnet.** 2011. *Regulatory T cells control HIV replication in activated T cells through a cAMP-dependent mechanism.* *Blood* **117**:5372-5380.
70. **Mullbacher, A., M. Lobigs, R. T. Hla, T. Tran, T. Stehle, and M. M. Simon.** 2002. *Antigen-dependent release of IFN-gamma by cytotoxic T cells up-regulates Fas on target cells and facilitates exocytosis-independent specific target cell lysis.* *J Immunol* **169**:145-150.
71. **Nagata, S.** 1996. *Fas-mediated apoptosis.* *Advances in experimental medicine and biology* **406**:119-124.
72. **Nair, S. R., G. Zelinsky, S. Schimmer, N. Gerlach, G. Kassiotis, and U. Dittmer.** 2010. *Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper cells and their functional impairment by regulatory T cells.* *The Journal of general virology* **91**:440-451.
73. **Nisole, S., J. P. Stoye, and A. Saib.** 2005. *TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence.* *Nat Rev Microbiol* **3**:799-808.
74. **Norris, P. J., H. F. Moffett, O. O. Yang, D. E. Kaufmann, M. J. Clark, M. M. Addo, and E. S. Rosenberg.** 2004. *Beyond help: direct effector functions of human immunodeficiency virus type 1-specific CD4(+) T cells.* *J Virol* **78**:8844-8851.
75. **Novembre, F. J., J. de Rosayro, S. Nidtha, S. P. O'Neil, T. R. Gibson, T. Evans-Strickfaden, C. E. Hart, and H. M. McClure.** 2001. *Rapid CD4(+) T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees.* *J Virol* **75**:1533-1539.
76. **O'Neil, S. P., F. J. Novembre, A. B. Hill, C. Suwyn, C. E. Hart, T. Evans-Strickfaden, D. C. Anderson, J. deRosayro, J. G. Herndon, M. Saucier, and H. M. McClure.** 2000. *Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees.* *J Infect Dis* **182**:1051-1062.
77. **Ploquin, M. J., U. Eksmond, and G. Kassiotis.** 2011. *B cells and TCR avidity determine distinct functions of CD4+ T cells in retroviral infection.* *J Immunol* **187**:3321-3330.
78. **Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo.** 1984. *Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.* *Science* **224**:497-500.
79. **Portnoy, D. A., R. D. Schreiber, P. Connelly, and L. G. Tilney.** 1989. *Gamma interferon limits access of Listeria monocytogenes to the macrophage cytoplasm.* *J Exp Med* **170**:2141-2146.
80. **Price, D. A., P. Klenerman, B. L. Booth, R. E. Phillips, and A. K. Sewell.** 1999. *Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity.* *Immunology today* **20**:212-216.
81. **Punkosdy, G. A., M. Blain, D. D. Glass, M. M. Lozano, L. O'Mara, J. P. Dudley, R. Ahmed, and E. M. Shevach.** 2011. *Regulatory T-cell expansion during chronic viral infection is dependent on endogenous retroviral superantigens.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:3677-3682.
82. **Qui, H. Z., A. T. Hagymasi, S. Bandyopadhyay, M. C. St Rose, R. Ramanarasimhaiah, A. Menoret, R. S. Mittler, S. M. Gordon, S. L. Reiner, A. T. Vella, and A. J. Adler.** 2011. *CD134 plus CD137 dual costimulation*

- induces Eomesodermin in CD4 T cells to program cytotoxic Th1 differentiation. *J Immunol* **187**:3555-3564.
83. **Rakenius, A.** 2005. *The activation-specific blockade of GPIIb/IIIa on platelets with single-chain antibodies and peptides. Inaugural-Dissertation.*
 84. **Reich, A., O. Erlwein, S. Niewiesk, V. ter Meulen, and U. G. Liebert.** 1992. CD4+ T cells control measles virus infection of the central nervous system. *Immunology* **76**:185-191.
 85. **Robertson, M. N., G. J. Spangrude, K. Hasenkrug, L. Perry, J. Nishio, K. Wehrly, and B. Chesebro.** 1992. Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice. *J Virol* **66**:3271-3277.
 86. **Robertson, S. J., R. J. Messer, A. B. Carmody, and K. J. Hasenkrug.** 2006. In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* **176**:3342-3349.
 87. **Robertson, S. J., R. J. Messer, A. B. Carmody, R. S. Mittler, C. Burlak, and K. J. Hasenkrug.** 2008. CD137 costimulation of CD8+ T cells confers resistance to suppression by virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* **180**:5267-5274.
 88. **Rous, P.** 1911. A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* **13**:397-411.
 89. **Ruscetti, S. K.** 1995. Erythroleukaemia induction by the Friend spleen focus-forming virus. *Baillieres Clin Haematol* **8**:225-247.
 90. **Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda.** 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**:1151-1164.
 91. **Schmidt, A., N. Oberle, and P. H. Krammer.** 2012. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology* **3**:51.
 92. **Schulze Zur Wiesch, J., A. Thomssen, P. Hartjen, I. Toth, C. Lehmann, D. Meyer-Olson, K. Colberg, S. Frerk, D. Babikir, S. Schmiedel, O. Degen, S. Mauss, J. Rockstroh, S. Staszewski, P. Khaykin, A. Strasak, A. W. Lohse, G. Fatkenheuer, J. Hauber, and J. van Lunzen.** 2011. Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. *J Virol* **85**:1287-1297.
 93. **Schütt C., B. B.** 2006. *Grundwissen Immunologie, vol. 1. Auflage. Elsevier GmbH.*
 94. **Shuford, W. W., K. Klussman, D. D. Tritchler, D. T. Loo, J. Chalupny, A. W. Siadak, T. J. Brown, J. Emswiler, H. Raecho, C. P. Larsen, T. C. Pearson, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, and R. S. Mittler.** 1997. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* **186**:47-55.
 95. **Soghoian, D. Z., H. Jessen, M. Flanders, K. Sierra-Davidson, S. Cutler, T. Pertel, S. Ranasinghe, M. Lindqvist, I. Davis, K. Lane, J. Rychert, E. S. Rosenberg, A. Piechocka-Trocha, A. L. Brass, J. M. Brenchley, B. D. Walker, and H. Streeck.** 2012. HIV-specific cytolytic CD4 T cell responses during acute HIV infection predict disease outcome. *Science translational medicine* **4**:123ra125.
 96. **Sourvinos, G., C. Tsatsanis, and D. A. Spandidos.** 2000. Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia Biol (Praha)* **46**:226-232.

97. Spiegel, H. M., G. S. Ogg, E. DeFalcon, M. E. Sheehy, S. Monard, P. A. Haslett, G. Gillespie, S. M. Donahoe, H. Pollack, W. Borkowsky, A. J. McMichael, and D. F. Nixon. 2000. Human immunodeficiency virus type 1- and cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes can persist at high frequency for prolonged periods in the absence of circulating peripheral CD4(+) T cells. *J Virol* **74**:1018-1022.
98. Stalder, T., S. Hahn, and P. Erb. 1994. Fas antigen is the major target molecule for CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **152**:1127-1133.
99. Steinman, R. M., and H. Hemmi. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**:17-58.
100. Stoye, J. P. 1998. Fv1, the mouse retrovirus resistance gene. *Rev Sci Tech* **17**:269-277.
101. Strauss, L., C. Bergmann, and T. L. Whiteside. 2009. Human circulating CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells kill autologous CD8+ but not CD4+ responder cells by Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* **182**:1469-1480.
102. Susanto, O., J. A. Trapani, and D. Brasacchio. 2012. Controversies in granzyme biology. *Tissue antigens* **80**:477-487.
103. Swain, S. L., K. K. McKinstry, and T. M. Strutt. 2012. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* **12**:136-148.
104. UNAIDS. 2012. *Global Report*
105. Varga, S. M., and R. M. Welsh. 1998. Stability of virus-specific CD4+ T cell frequencies from acute infection into long term memory. *J Immunol* **161**:367-374.
106. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* **8**:523-532.
107. Voisset, C., O. Bouton, F. Bedin, L. Duret, B. Mandrand, F. Mallet, and G. Paranhos-Baccala. 2000. Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:731-740.
108. von Gegerfelt, A., A. Valentin, C. Alicea, K. K. Van Rompay, M. L. Marthas, D. C. Montefiori, G. N. Pavlakis, and B. K. Felber. 2010. Emergence of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic CD4+ T cells and increased humoral responses correlate with control of rebounding viremia in CD8-depleted macaques infected with Rev-independent live-attenuated simian immunodeficiency virus. *J Immunol* **185**:3348-3358.
109. Wallach, D., E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. V. Goltsev, A. V. Kovalenko, and M. P. Boldin. 1999. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* **17**:331-367.
110. Wherry, E. J., J. N. Blattman, K. Murali-Krishna, R. van der Most, and R. Ahmed. 2003. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* **77**:4911-4927.
111. www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/7.html. 12.04.2013.
112. Zelinskyy, G., S. Balkow, S. Schimmer, K. Schepers, M. M. Simon, and U. Dittmer. 2004. Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology* **330**:365-374.
113. Zelinskyy, G., S. Balkow, S. Schimmer, T. Werner, M. M. Simon, and U. Dittmer. 2007. The level of friend retrovirus replication determines the cytolytic pathway of CD8+ T-cell-mediated pathogen control. *J Virol* **81**:11881-11890.

-
114. **Zelinskyy, G., K. Dietze, T. Sparwasser, and U. Dittmer.** 2009. *Regulatory T cells suppress antiviral immune responses and increase viral loads during acute infection with a lymphotropic retrovirus.* *PLoS Pathog* **5**:e1000406.
 115. **Zelinskyy, G., K. K. Dietze, Y. P. Husecken, S. Schimmer, S. Nair, T. Werner, K. Gibbert, O. Kershaw, A. D. Gruber, T. Sparwasser, and U. Dittmer.** 2009. *The regulatory T-cell response during acute retroviral infection is locally defined and controls the magnitude and duration of the virus-specific cytotoxic T-cell response.* *Blood* **114**:3199-3207.
 116. **Zelinskyy, G., A. R. Kraft, S. Schimmer, T. Arndt, and U. Dittmer.** 2006. *Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection.* *Eur J Immunol* **36**:2658-2670.
 117. **Zelinskyy, G., S. J. Robertson, S. Schimmer, R. J. Messer, K. J. Hasenkrug, and U. Dittmer.** 2005. *CD8+ T-cell dysfunction due to cytolytic granule deficiency in persistent Friend retrovirus infection.* *J Virol* **79**:10619-10626.
 118. **Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty.** 1974. *Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.* *Nature* **248**:701-702.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

7AAD 7-Aminoactinomycin D

A

AF Alexa Fluor

AIDS erworbenes Immundefizienzsyndrom (Acquired Immune Deficiency Syndrome)

AK Antikörper

APC Antigen präsentierende Zelle

APC Allophycocyanin

B

BAC Bacterial Artificial Chromosome

BFA Brefeldin A

bp Basenpaare

BrdU Bromodeoxyuridin

BSA Rinderserumalbumin

C

C Celsius

CD Nomenklatur für Zelloberflächenmoleküle (Cluster of differentiation)

CFSE Carboxyfluorescein succinimidyl ester

chron chronisch

CTL Zytotoxische T-Lymphozyten

CTLA-4 Zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4

D

d Tage (days)

DC Dendritische Zelle

DEREG Depletion von regulatorischen T-Zellen (**d**epletion of **r**egulatory T cell)

DMSO Dimethylsulfoxid

| | |
|------------|---|
| <i>DNA</i> | <i>Desoxyribonukleinsäure</i> |
| <i>ds</i> | <i>Doppelsträngig (double-stranded)</i> |
| <i>DT</i> | <i>Diphtherietoxin</i> |

E

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| <i>EBV</i> | <i>Epstein-Barr Virus</i> |
| <i>EDTA</i> | <i>Ethylendiamintetraessigsäure</i> |
| <i>eF450</i> | <i>eFluor 450</i> |
| <i>env</i> | <i>Virushülle (envelope)</i> |
| <i>EPO-R</i> | <i>Erythropoietinrezeptor</i> |
| <i>ER</i> | <i>Endoplasmatisches Retikulum</i> |

F

| | |
|---------------|---|
| <i>FACS</i> | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> |
| <i>FasL</i> | <i>Fas Ligand</i> |
| <i>FCS</i> | <i>Fötales Kälberserum</i> |
| <i>FeLV</i> | <i>Felines Leukosevirus</i> |
| <i>FITC</i> | <i>Fluorescein-Isothiocyanat</i> |
| <i>FIV</i> | <i>Felines Immundefizienz Virus</i> |
| <i>F-MuLV</i> | <i>Friend murine leukemia virus</i> |
| <i>Foxp3</i> | <i>Forkhead box P3</i> |
| <i>FSC</i> | <i>Vorwärtsstreulicht (forward scatter)</i> |
| <i>FV</i> | <i>Friend Retrovirus</i> |

G

| | |
|------------|--|
| <i>g</i> | <i>Gravitation, Erdbeschleunigung</i> |
| <i>g</i> | <i>Gramm</i> |
| <i>gag</i> | <i>Gruppenspezifische Antigene</i> |
| <i>GFP</i> | <i>Grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)</i> |
| <i>gp</i> | <i>Glykoprotein</i> |
| <i>Gzm</i> | <i>Granzym</i> |

H

| | |
|----------|---------------|
| <i>h</i> | <i>Stunde</i> |
|----------|---------------|

| | |
|--------------|--|
| <i>HAART</i> | <i>Hochaktive antiretrovirale Therapie (Highly Active Anti-Retroviral Therapy)</i> |
| <i>HCV</i> | <i>Hepatitis C Virus</i> |
| <i>HIV</i> | <i>Humanes Immundefizienzvirus</i> |
| <i>HRP</i> | <i>Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase)</i> |
| <i>HSV</i> | <i>Herpes Simplex Virus</i> |
| <i>HTLV</i> | <i>Humanes T-Zell-lymphotropes Virus</i> |

I

| | |
|-------------|---|
| <i>IC</i> | <i>infectious center</i> |
| <i>Ig</i> | <i>Immunglobulin</i> |
| <i>IL</i> | <i>Interleukin</i> |
| <i>IFN</i> | <i>Interferon</i> |
| <i>inf</i> | <i>infiziert</i> |
| <i>i.p.</i> | <i>intraperitoneal</i> |
| <i>IPEX</i> | <i>immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome</i> |
| <i>i.v.</i> | <i>Intravenös</i> |

K

| | |
|------------|-------------------|
| <i>Kb</i> | <i>Kilobase</i> |
| <i>kDA</i> | <i>Kilodalton</i> |

L

| | |
|---------------|--|
| <i>l</i> | <i>Liter</i> |
| <i>LAMP-1</i> | <i>lysosomal-associated membrane protein 1</i> |
| <i>LCMV</i> | <i>Lymphozytäres Choriomeningitis Virus</i> |
| <i>LDV</i> | <i>Lactate dehydrogenase-elevating virus</i> |
| <i>LTR</i> | <i>Long terminal repeats</i> |

M

| | |
|-------------|---|
| μ | <i>mikro</i> |
| <i>m</i> | <i>milli</i> |
| <i>M</i> | <i>Molar</i> |
| <i>MACS</i> | <i>Magnetic Cell Sorting</i> |
| <i>MHC</i> | <i>Haupthistokompatibilitätskomplex</i> |

| | |
|---------------------------------------|--|
| <i>min</i> | <i>Minuten</i> |
| <i>MIP-1α,β</i> | <i>Macrophage Inflammatory Protein-1</i> |
| <i>MOI</i> | <i>Multiplizität der Infektion</i> |
| <i>mRNA</i> | <i>messenger RNA</i> |

N

| | |
|-----------------|-------------------------------|
| <i>n</i> | <i>nano</i> |
| <i>NK-Zelle</i> | <i>Natürliche Killerzelle</i> |

P

| | |
|----------------|--|
| <i>PAF</i> | <i>Plättchen aktivierender Faktor</i> |
| <i>PAMP</i> | <i>pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular pattern)</i> |
| <i>PE</i> | <i>Phycoerythrin</i> |
| <i>PE Cy7</i> | <i>Phycoerythrin-Cy7</i> |
| <i>PerCP</i> | <i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i> |
| <i>pH</i> | <i>negative dekadischer Logarithmus der Oxoniumionenkonzentration (lat. potentia Hydrogenii)</i> |
| <i>PI</i> | <i>Propidiumiodid</i> |
| <i>pit-1/2</i> | <i>inorganic phosphate transporter</i> |
| <i>pol</i> | <i>Polymerase</i> |
| <i>pro</i> | <i>Protease</i> |

R

| | |
|---------------|--|
| <i>RANTES</i> | <i>Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i> |
| <i>rER</i> | <i>raues Endoplasmatisches Retikulum</i> |
| <i>RNA</i> | <i>Ribonukleinsäure</i> |
| <i>RSV</i> | <i>Rous Sarkom Virus</i> |
| <i>RT</i> | <i>Raumtemperatur</i> |
| <i>RT</i> | <i>Reverse Transkriptase</i> |

S

| | |
|-------------|-----------------------------------|
| <i>SFFU</i> | <i>spleen focus forming units</i> |
| <i>SFFV</i> | <i>spleen focus forming virus</i> |
| <i>SFV</i> | <i>Simianes Foamyvirus</i> |

| | |
|------------|---|
| <i>SIV</i> | <i>Simianes Immundefizienzvirus</i> |
| <i>ss</i> | <i>Einzelsträngig (single-stranded)</i> |
| <i>SSC</i> | <i>Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)</i> |
| <i>SPF</i> | <i>Speziell pathogenfrei</i> |

T

| | |
|-----------------|---|
| <i>Tab.</i> | <i>Tabelle</i> |
| <i>TCR</i> | <i>T-Zell-Rezeptor</i> |
| <i>Tetr</i> | <i>Tetramer</i> |
| <i>TGF</i> | <i>Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)</i> |
| <i>Th-Zelle</i> | <i>T-Helfer-Zelle</i> |
| <i>TLR</i> | <i>Toll-ähnlicher-Rezeptor</i> |
| <i>TNF</i> | <i>Tumor Nekrose Faktor</i> |

8.2 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------------|--|----|
| Abbildung 1.1 | Schematischer Aufbau eines Retrovirus (107) | 2 |
| Abbildung 1.2 | Repräsentative Genome einfacher (MuLV) und komplexer (HIV-1) Retroviren | 3 |
| Abbildung 1.3 | Replikationszyklus von Retroviren | 5 |
| Abbildung 1.4 | Schematische Darstellung der MHC I und II Moleküle | 12 |
| Abbildung 1.5 | MHC Prozessierung. | 13 |
| Abbildung 1.6 | GzmB vermittelte Apoptoseinduktion. | 19 |
| Abbildung 1.7 | FasL vermittelte Apoptoseinduktion. | 20 |
| Abbildung 1.8 | Definition der CD4 ⁺ Subpopulationen..... | 22 |
| Abbildung 1.9 | Antivirale Funktionen von CD4 ⁺ T –Zellen. | 24 |
| Abbildung 1.10 | Selektive Depletion regulatorischer T-Zellen in DEREK Mäusen.. | 26 |
| Abbildung 3.1 | Funktionsweise eines Durchflusszytometers | |
| | (verändert nach (83)) | 46 |
| Abbildung 3.2 | Aufbau eines MHC Klasse II-Tetramers (verändert nach (29)) | 49 |
| Abbildung 4.1 | Kinetik der Proliferation der Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz. | 53 |
| Abbildung 4.2. | Expansion FV-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen in Milz und Knochenmark 10 Tage nach FV-Infektion..... | 54 |
| Abbildung 4.3 | Vergleichende Expressionsanalyse | 56 |
| Abbildung 4.4 | Anwendung der Markerkombination..... | 57 |
| Abbildung 4.5 | Kinetik der Expansion aktivierter CD4 ⁺ T-Zellen in der Milz. | 58 |
| Abbildung 4.6 | Expression von Effektorzytokinen durch FV-induzierte Effektor CD4 ⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4 ⁺ T-Zellen aus naiven Tieren. | 60 |
| Abbildung 4.7 | Zytotoxisches Potential von Effektor CD4 ⁺ T-Zellen..... | 61 |
| Abbildung 4.8 | Kinetik der Proliferation der Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ Tregs in der Milz..... | 62 |
| Abbildung 4.9 | Selektive Depletion von Tregs in der akuten FV-Infektion..... | 63 |
| Abbildung 4.10 | Selektive Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen in der akuten FV-Infektion..... | 64 |
| Abbildung 4.11 | Einfluss von Tregs und CD8 ⁺ T-Zellen auf die Expansion von Effektor- und FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen. | 66 |
| Abbildung 4.12 | Einfluss von Tregs und CD8 ⁺ T-Zellen auf die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2 und IL-4 durch CD4 ⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion. | 67 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 4.13 Einfluss von Tregs und CD8 ⁺ T-Zellen auf das zytotoxische Potential von CD4 ⁺ T-Zellen während der akuten FV-Infektion..... | 69 |
| Abbildung 4.14 Effekt der In Vivo Stimulation des CD137 Rezeptors auf die Expansion von Effektor CD4 ⁺ T-Zellen und FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen..... | 71 |
| Abbildung 4.15 Effekt der In Vivo Stimulation des CD137 Rezeptors auf die Expression der Zytokine IFN- γ und IL-2 in CD4 ⁺ T-Zellen. | 72 |
| Abbildung 4.16 Effekt der In Vivo Stimulation des CD137 Rezeptors auf die Expression des zytotoxischen Moleküls GzmB von CD4 ⁺ T-Zellen. | 73 |
| Abbildung 4.17 Viruslast in der Milz während der akuten FV-Infektion nach T-Zelldepletion..... | 75 |
| Abbildung 4.18 Auswirkung der chronischen FV-Infektion auf die Expansion von Effektor CD4 ⁺ T-Zellen in Milz und Lymphknoten..... | 76 |
| Abbildung 4.19 Expansion der FV-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen nach chronischer FV-Infektion im Vergleich zu naiven Tieren. | 77 |
| Abbildung 4.20 Selektive Depletion von regulatorischen T-Zellen in der chronischen FV-Infektion..... | 78 |
| Abbildung 4.21 Proliferierende CD4 ⁺ T-Zellen in naiven, chronischen sowie chronischen Treg depletierten Mäusen..... | 79 |
| Abbildung 4.22 Einfluss von Tregs auf die IFN- γ Expression durch CD4 ⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion..... | 80 |
| Abbildung 4.23 Einfluss von Tregs auf die IL-2 Expression durch CD4 ⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion..... | 81 |
| Abbildung 4.24 Einfluss von Tregs auf die TNF- α Expression durch CD4 ⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion..... | 82 |
| Abbildung 4.25 Einfluss von Tregs auf die GzmB Expression durch CD4 ⁺ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion..... | 83 |

8.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| <i>Tabelle 2.1 Verwendete Geräte</i> | 33 |
| <i>Tabelle 2.2 Verwendete Materialien</i> | 34 |
| <i>Tabelle 2.3 Puffer und Medien</i> | 36 |
| <i>Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper</i> | 37 |
| <i>Tabelle 2.5 Charakterisierung der Fluorochrome</i> | 38 |
| <i>Tabelle 2.6 Verwendete Standardtests</i> | 38 |
| <i>Tabelle 2.7 Verwendete Zelllinien</i> | 39 |

8.4 Publikation

CD4⁺ T cells develop anti-retroviral cytotoxic activity in the absence of regulatory T cells and CD8⁺ T cells

Nora Manzke, Ilseyar Akhmetzyanova, Kim J Hasenkrug, Mirko Trilling, Gennadiy Zelinskyy, and Ulf Dittmer*

J. Virol. JVI.00432-13; Epub 27 March 2013

8.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulf Dittmer und meinem Betreuer Dr. Gennadiy Zelinskyy für die gute Betreuung meiner Arbeit sowie die vielen hilfreichen Diskussionen und Ratschläge danken.

Bei Kim Hasenkrug und Mirko Trilling möchte ich mich für die Unterstützung in Zusammenhang mit meiner Veröffentlichung bedanken.

Bei Ilseyar, Kirsten, Kathrin, Jara, Elisabeth, Inga, Sonja, Simone, Tanja, Sandra und Wibke möchte ich mich für die letzten drei Jahre bedanken. Ihr alle habt maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, wart mit Rat und Tat zur Seite.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Virologie sei für die freundschaftlich kollegiale Zusammenarbeit gedankt.

Großer Dank gilt auch den Mitgliedern des Graduiertenkollegs 1045 und des Transregio 60, für die wissenschaftliche Unterstützung und die Diskussionen.

Meinen Eltern möchte ich für die Möglichkeiten danken, die sie mir so selbstverständlich in meinem Leben eröffnet haben, für die große Liebe und den bedingungslosen Rückhalt den sie mir entgegenbringen.

Mein Vater und besonders seine Frau Gaby haben dafür gesorgt, dass diese Arbeit eine leserliche Form angenommen hat, dafür danke ich ihnen, auch im Namen all derer, die diese Arbeit nun annähernd fehlerfrei lesen können.

Meiner Mutter danke ich für die vielen kleinen und großen Aufmunterungen, die mich an einigen Stellen vor der Verzweiflung bewahrt haben.

Meinen Freunden danke ich dafür, dass sie für mich da sind, wenn ich sie brauche, besonders dann, wenn ich mal den Kopf frei bekommen muss. Herr Göthe(I), danke fürs Zitat.

Meinem Freund Jan danke ich dafür, dass er an mich glaubt, mich bestärkt, mir hilft und ganz besonders dafür, dass er in mein Leben getreten ist.

8.6 Lebenslauf

Persönliche Informationen

Geburtsdatum 22.09.1982
 Geburtsort Hattingen, Deutschland
 Nationalität deutsch



Bildung

12.2009 *Dissertation am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Duisburg-Essen. Abteilung für experimentelle Virologie, AG Prof. Ulf Dittmer. Thema der Dissertation: **„Untersuchung der zytotoxischen CD4⁺ T-Zellantwort in der akuten und chronischen Friend Retrovirus Infektion“***

11.2009 *Abschluss des Masterstudiums Medizinische Biologie
 Abschlussnote: 1,9*

01.2009 - 08.2009 *Gastwissenschaftlerin an der Stanford University, Kalifornien, USA
 Anfertigung des praktischen Teils der Masterarbeit.
 Titel der Masterarbeit: **“shRNA-mediated knock down of the checkpoint control proteins p38 and MK2 in human and murine cell lines- influence on the response to chemotherapeutic drugs”***

10.2007 - 10.2009 *Masterstudium Medizinische Biologie an der Universität Duisburg Essen*

09.2007 *Abschluss des Bachelorstudiums Medizinische Biologie
 Abschlussnote: 2,4
 Titel der Bachelorarbeit: **„Transgene Expression von MGMT in einer lymphoblastoiden Zelllinie: Einfluss auf Reparaturverhalten und Chemosensitivität“***

10.2004 - 09.2007 *Bachelorstudium Medizinische Biologie an der Universität Duisburg-Essen*

09.2003 - 08.2004 *Medizinstudium, Université du Luxembourg*

07.2002 *Allgemeine Hochschulreife, Gesamtschule Hattingen,
 Abschlussnote: 2,2*

Witten, den 01.05.2013

8.7 Erklärungen

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchung der zytotoxischen CD4⁺ T-Zellantwort in der akuten und chronischen Friend Retrovirus Infektion“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Nora Manzke befürworte.

Essen, den _____
Ulf Dittmer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____
Nora Manzke

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Math.-Nat.-Fachbereiche zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Witten, den _____
Nora Manzke